



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR MORBILIVÍRUS EM CETÁCEOS ARROJADOS NA COSTA PORTUGUESA

MARIA CAROLINA ROCHA DE MEDEIROS BENTO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR MORBILIVÍRUS EM CETÁCEOS ARROJADOS NA COSTA PORTUGUESA

MARIA CAROLINA ROCHA DE MEDEIROS BENTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

2011

LISBOA



À memória da Elisabete.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, a Doutora Ana Duarte pela paciência e pela ajuda e ao meu co-orientador, Doutor Fernando Afonso.

Um obrigada especial à Dra. Marisa Ferreira e ao Doutor José Vingada que me ajudaram a encontrar um caminho e que me permitiram descobrir uma área apaixonante da medicina veterinária. Não seria possível ter feito este trabalho sem o apoio e colaboração do Centro de Reabilitação de Animais Marinhos de Quaios (CRAM-Q) e de todos os que lá trabalham.

Ao Laboratório Nacional de Investigação Veterinária e especialmente à Doutora Margarida Duarte pela ajuda e disponibilidade.

Obrigada a todas as pessoas que me ajudaram durante o período que passei no laboratório da F.M.V. em especial à Sofia e Elisabete pela paciência e disponibilidade.

À minha família.

Aos meus padrinhos.

A todos os meus amigos por estarem sempre comigo e me terem ajudado a ultrapassar os obstáculos e me ajudarem a perceber que nunca estamos sós.

Resumo

Avaliação da Infecção por Morbilivírus em Cetáceos Arrojados na Costa Portuguesa

O Dolphin morbilivírus (DMV) e o Porpoise morbillivirus (PMV) são membros da subfamília *Paramyxovirinae*, família *Paramyxoviridae*. Estes vírus são importantes nos cetáceos uma vez que em conjunto com outros factores podem afectar a sobrevivência destas espécies, havendo registos de epidemias em animais marinhos desde 1987. Até agora, não havia informação a este respeito relativa a animais arrojados na costa portuguesa. Neste trabalho realizou-se um rastreio de antígeno viral em amostras recolhidas em cetáceos arrojados disponibilizadas pela Rede Nacional de Arrojamentos e pelo CRAM-Q – Centro de Reabilitação de Animais Marinhos de Quiaios.

Amostras de pulmão e cérebro (n=40) foram recolhidas entre 2004 e 2011 de 25 *Delphinus delphis*, 4 *Globicephala sp.*, 8 *Stenella coeruleoalba*, 2 *Phocoena phocoena* e 1 *Mesoplodon mirus*. Após extracção de ARN total as amostras foram testadas por rt-PCR convencional. Os *primers* foram escolhidos através de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> e amplificam fragmentos com 550 pb do gene M do DMV. Obtiveram-se três amostras positivas que foram sequenciadas e a sua especificidade foi confirmada na base de dados da NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e as amostras mostraram partilhar 99% de homologia com as duas sequências disponíveis para o gene M do DMV. Assim, 7,5% dos animais foram positivos a ácido nucleico (dois *Stenella coeruleoalba* de 2007 e 2011 e um *Globicephala melas* de 2008).

Para a análise de anticorpos utilizou-se um kit de ELISA para detecção de anticorpos anti-esgana de cão da Ingezim e analisaram-se 37 amostras. Para substituição do anticorpo anti-espécie conjugado utilizou-se a proteína-A conjugada com a peroxidase devido à afinidade desta proteína para a fracção Fc dos anticorpos. Obtiveram-se 8 amostras seropositivas, representando 21,6% das amostras. Com este trabalho conclui-se que há circulação de morbilivírus nas populações de odontocetes que arrojam em Portugal.

Palavras-chave: Morbilivírus, cetáceos arrojados, sequenciação, anticorpos.

Abstract

Evaluation of Morbillivirus Infection in Cetaceans Stranded Along the Portuguese Coast

Dolphin morbillivirus (DMV) and porpoise morbillivirus (PMV) are members of the subfamily *Paramyxovirinae*, family *Paramyxoviridae*. These virus can have a major impact in cetacean populations specially when combined with other stress factors. It was reported in cetaceans for the first time in 1987 and until now there was no available information about this virus in animals stranded in the portuguese coast.

In this study a survey was conducted in order to detect viral antigen in samples from stranded cetaceans that were provided by the portuguese national strandings network and by CRAM-Q – Rehabilitation Centre for Marine Animals - Quiaios.

Samples of lung and brain (n=40) collected between 2004 and 2011 were tested: 25 *Delphinus delphis*, 4 *Globicephala sp.*, 8 *Stenella coeruleoalba*, 2 *Phocoena phocoena* and 1 *Mesoplodon mirus*.

After total RNA extraction these samples were tested by conventional one-step RT-PCR and the primers targeting a 550 bp fragment included in the M gene of the DMV/PMV genome were chosen by the Primer Designing Tool available through <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

The expected amplicon was detected in the lung samples of two Sc and one Gm, collected in 2007, 2011 and 2008 respectively. After sequencing its specificity was confirmed against the NCBI nucleotide database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sharing 99% homology with the two available sequences of DMV M gene.

In order to detect antibodies anti-DMV an ELISA kit for CDV antibodies (Ingezim) was used and a total of 37 samples were tested. The kit was adapted and protein-A peroxidase was used instead of the conjugated serum provided since this protein has affinity to bind to the Fc fraction of mammalian imunoglobulins. 21,6% (n=37) of the samples were considered to be positive. This study allowed the confirmation of Morbillivirus circulation among the cetacean populations that strand in Portugal.

Palavras-chave: Morbillivirus, stranded cetaceans, sequencing, antibodies.

Lista de Comunicações Científicas

Deste trabalho resultou um poster científico apresentado no Congresso Microbiotec'11 que teve lugar nos dias 1-3 de Dezembro de 2011 na Universidade do Minho, Braga:

- Bento, C.; Duarte, A.; Ferreira, M.; Afonso, F.; Vingada, J.; Tavares, L.; Dolphin morbillivirus in Portugal: first report in stranded cetaceans. Congresso Microbiotec 2011, 1-3 Dezembro. Braga. Portugal. (Anexo 4)

Índice

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de comunicações científicas.....	v
Índice.....	vi, vii, viii, ix
1. Introdução.....	1
1.1. Estágio curricular.....	1
1.2. Cetáceos na costa portuguesa	6
1.2.1. <i>Stenella coeruleoalba</i> (Meyen, 1833) (Golfinho-riscado).....	7
1.2.2. <i>Delphinus delphis</i> (Linnaeus, 1758) (Golfinho comum).	9
1.2.3. <i>Phocoena phocoena</i> (Linnaeus, 1758) (Bôto).	10
1.2.4. <i>Globicephala melas e macrorhynchus</i> (Traill, 1809) - <i>Globicephala sp.</i> (Baleia piloto).	11
1.2.5. <i>Mesoplodon mirus</i> (True, 1913) (Baleia-de-bico).	13
1.3. Morbilivírus.....	14
1.3.1 Caracterização	14
1.3.2. Epidemiologia.....	17
1.3.3 Patogénese	22
1.3.4 Patologia, sinais clínicos e diagnóstico	23
2 Materiais e Métodos	26
2.1. Amostras e seu processamento	26
2.3 Extracção de ARN e detecção de antígeno.....	28
2.4 Processamento de amostras e detecção de anticorpos	31
2.5 Histologia e Imunohistoquímica.....	32
3 Resultados.....	34

3.1. RT-PCR (<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>).....	34
3.3 Elisa	37
3.4 Histologia e imunohistoquímica	39
4 Discussão e conclusões.....	42
Bibliografia.....	50
Anexo 1 – Ficha de biometria de cetáceos utilizado em todas as necrópsias.....	62
Anexo 2 – Ficha de recolha de amostras que é utilizada como guia de recolhas para todas as necrópsias de cetáceos.....	64
Anexo 3 – Ensaio realizados às amostras de macerados de pulmão dos 37 cetáceos analisados por ELISA para detecção de anticorpos anti-CDV.	66
Anexo 4 – Resumo da comunicação científica apresentada no Congresso Microbiotec’11 de 1-3 de Dezembro na Universidade do Minho e comprovativo de aceitação.	68

Índice de tabelas

Tabela 1- Espécies susceptíveis aos morbilivírus e doença causada (Adaptado de Fenner Veterinary Virology).	14
Tabela 2- Glicoproteínas que constituem os morbilivírus e suas funções.	17
Tabela 3 - Espécies e número de animais utilizados neste trabalho.	26
Tabela 4 - Listagem de amostras utilizadas neste trabalho (ano, espécie e materiais utilizados) e quantificação de ARN total e dos volumes necessários para uma reacção de 50 ng.....	28
Tabela 5 - <i>Primers</i> utilizados no rt PCR, sua localização e dimensão, com base na sequência do gene M (DMV NC_005283.1)	

Índice de Ilustrações

Imagem 1- Exemplos de animais arrojados na nossa costa em cujas necrópsias cooperei: a - Balaenoptera acuturorotrata (Baleia anã); b - Caretta caretta (Tartaruga-boba).	2
Imagem 2 - Simulacro da marinha portuguesa de um derrame de petróleo ao largo da costa da Figueira da Foz no qual se inclui uma simulação de um arrojamento vivo de um golfinho.	3

Imagem 3 - Ilustração representativa de golfinhos riscados (<i>Stenella coeruleoalba</i>) (retirado de http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/).	7
Imagem 4 - Mapa da distribuição mundial da espécie <i>Stenella coeruleoalba</i> (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).	8
Imagem 5 - Ilustração representativa de um golfinho comum (<i>Delphinus delphis</i>) (retirado de http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/).	9
Imagem 6 - Mapa da distribuição mundial da espécie <i>Delphinus delphis</i> (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).	10
Imagem 7 - Ilustração representativa de um bôto (<i>Phocoena phocoena</i>) (retirado de http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/).	10
Imagem 8 - Mapa da distribuição mundial da espécie <i>Phocoena phocoena</i> (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).	11
Imagem 9 - Ilustração representativa de baleias piloto (<i>Globicephala melas</i>) (retirado de http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/).	11
Imagem 10 - Mapa da distribuição mundial da espécie <i>Globicephala melas</i> (a) e <i>Globicephala macrorhynchus</i> (b), respectivamente (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).	12
Imagem 11 - Ilustração representativa de uma baleia de bico de True (<i>Mesoplodon mirus</i>) (retirado de http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/).	13
Imagem 12 - Mapa da distribuição mundial da espécie <i>Mesoplodon mirus</i> (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).	13
Imagem 13 - Representação esquemática de um virião de morbilivírus (Adaptado de Fenner Veterinary Virology).	15
Imagem 14 - Representação esquemática do virião dos morbilivírus com as glicoproteínas que o constituem e do seu genoma (adaptado de http://viralzone.expasy.org). A Transcrição viral ocorre num gradiente, devido à actividade da RNA polimerase que transcreve os genes localizados no extremo 3' do genoma em maiores quantidades do que os genes localizados no extremo 5'	17
Imagem 15 - Mapa mundial com identificação dos eventos mais importantes na história dos morbilivírus que afectam animais marinhos: Lago Baikal, Mar do Norte, Mar Báltico, Irlanda, Costa este dos EUA, Golfo do México, Mediterrâneo e Mar Negro.	21
Imagem 16 - Árvore filogenética baseada na análise de sequências de regiões altamente conservadas do gene P dos diferentes morbilivírus. (Retirado de Grant 2008).	22
Imagem 17 - Distribuição por sexos dos animais utilizados neste trabalho.	27
Imagem 18 - Maturidade sexual dos animais utilizados neste trabalho.	27
Imagem 19 - Gel de agarose a 2% com 2,5% de gel RED: 1 – DD/137/2011; 2 – DD/141/2011; 3 – DD/156/2011; 4 – SC/159/2011; 5 – DD/160/2011; 6 – DD/162/2011; 7 – DD/166/2011; 8 – DD/167/2011;	

9 – SC/13/2007; 10 – SC/15/2007; 11 – SC/21/2007; 12 – GM/35/2008; 13 – GM/19/2009; 14 – GM/47/2009; 15 e 16 – controles negativos; M - marcador.	34
Imagem 20 - Gel de agarose correspondente à amplificação das bandas obtidas anteriormente : 1 e 2 – controle negativo; 3 – GM/42/2008; 4 – DD/186/2011; 5 – SC/257/2011; M – marcador.....	35
Imagem 21 - Alinhamento nucleotídico das amostras 15SC2007, 257SC2011 e 42GM2008 com as sequências homologas de DMV disponíveis na base de dados do Genbank, através dos seus números de acesso AJ608288 (<i>DMV complete genome</i>) e Z30087 (<i>DMV, M mRNA for structural protein</i>). A sequência consenso é apresentada. (Programa Pileup e Pretty, GCG Winsconsin Package V10.0, disponível através do PEN, IGC.....	36
Imagem 22 - Resultados dos ensaios de ELISA realizados às amostras agrupados por espécie.....	38
Imagem 23 - Percentagem de machos e fêmeas com Ac detectáveis pelo kit anti-CDV utilizado no ensaio ELISA realizado.	38
Imagem 24 - Imagens de microscópio óptico com ampliação de 100x e de 400x de cortes histológicos de pulmão do animal SC/257/2011 com granulomas parasitários.	39

1. Introdução

1.1. Estágio curricular

O presente trabalho foi o resultado de um estágio curricular inserido no Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL). O estágio teve a duração de seis meses e foi realizado entre Janeiro e Junho de 2011 no Centro de Reabilitação de Animais Marinhos de Quiaios e no Laboratório de Virologia e de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, sob a orientação da Professora Ana Duarte e com co-orientação do Professor Fernando Afonso. Parte do trabalho foi desenvolvido com o apoio do projecto SAFESEA - Sustentabilidade das Artes de pesca locais e promoção de um mar seguro para os cetáceos, financiado pelo programa EEA Grants.

No Centro de Reabilitação de Animais Marinhos de Quiaios assisti e cooperei em necrópsias realizadas a cetáceos arrojados na costa portuguesa, em especial na zona norte e centro; assisti e colaborei na reabilitação de animais marinhos que foram admitidos no centro neste período, maioria dos quais tartarugas marinhas da espécie *Caretta caretta*; assisti e realizei procedimentos médicos ao golfinho comum que se encontra no centro com o objectivo de monitorizar e assegurar a sua reabilitação.

O processamento das amostras recolhidas, com o objectivo de avaliar a presença de *Dolphin Morbillivirus* (DMV) em materiais biológicos recolhidos e armazenados no banco de tecidos do Centro de Reabilitação de Animais Marinhos de Quiaios foi efectuado no laboratório de virologia da FMV-UTL, para detecção molecular de DMV, no laboratório de Anatomia Patológica para observação de lesões microscópicas nos tecidos e no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária para detecção de anticorpos.

Durante os 6 meses que durou o meu estágio, cooperei na recolha de animais arrojados e nas necrópsias a animais das espécies: *Delphinus delphis* (golfinho comum), *Tursiops truncatus* (roaz), *Stenella coeruleoalba* (golfinho riscado), *Phocoena phocoena* (bôto), *Balaenoptera acutorostrata* (baleia anã), *Balaenoptera physalus* (baleia comum) e *Mesoplodon mirus*

(baleia de bico). Cooperei ainda nas necrópsias de aves marinhas da espécie *Morus bassanus* (ganso-patola) e *Alca torda* (torda-mergulheira) e de tartarugas marinhas das espécies *Caretta caretta* (tartaruga-boba) e *Dermochelys coriacea* (tartaruga-de-couro).

Imagem 1- Exemplos de animais arrojados na nossa costa em cujas necrópsias cooperei:
a - *Balaenoptera acuturoristrata* (Baleia anã); b - *Caretta caretta* (Tartaruga-boba).



No âmbito das actividades relacionadas com o centro de reabilitação, cooperei na reabilitação de animais das seguintes espécies: *Larus spp.* (gaivotas), *Morus bassanus* (gansos-patola), *Halichoerus grypus* (foca-cinzenta), *Caretta caretta* (tartaruga-boba), *Delphinus delphis* (golfinho-comum), entre outros. Durante os 6 meses do meu estágio deram entrada no CRAM-Q 51 animais, 23 dos quais foram libertados após concluírem o processo de reabilitação, sendo que 5 animais foram eutanasiados e não foram reabilitados. Apenas 15

animais morreram durante a reabilitação, sendo que nos outros casos a morte ocorreu durante o transporte para o centro. Houve ainda um caso de um animal que foi transferido para outro centro de reabilitação. Dos animais referidos, a maioria eram da espécie *Caretta caretta* (tartaruga-boba) e gaivotas, de diversas espécies (*Larus spp.*). As actividades realizadas incluíram cooperação na decisão de medicações e procedimentos veterinários, recolhas de sangue e biometrias, interpretação de análises complementares e identificação de animais pré-libertação pela aplicação de *microchips*, *satellite tags*, entre outros. Tive ainda o privilégio de participar em acções de libertação de animais que concluíram com sucesso o processo de reabilitação, nomeadamente no caso de duas tartarugas marinhas da espécie *Caretta caretta* que se encontravam em reabilitação no CRAM-Q durante o período em que decorreu o meu estágio, cuja rota foi seguida após libertação por satélite por um período aproximado de três meses.

Participei ainda noutras actividades, como foi o caso de um simulacro de derrame de petróleo realizado pela Marinha Portuguesa em colaboração com outras entidades e no qual foi incluído um arrojamento vivo de um golfinho (imagem 2).

Imagem 2 - Simulacro da marinha portuguesa de um derrame de petróleo ao largo da costa da Figueira da Foz no qual se inclui uma simulação de um arrojamento vivo de um golfinho.



Entre Janeiro e Junho de 2011 participei na recolha de 116 cetáceos que arrojaram em praias pertencentes a 6 distritos do litoral português: Aveiro, Coimbra, Leiria, Lisboa, Porto e Viana do Castelo. Dos arrojamentos em que colaborei, a maioria (34,5%) registaram-se no distrito de Coimbra, 23,3% no distrito do Porto e 24,4% em Aveiro.

Apenas 2,6% destes arrojamentos ocorreram no distrito de Lisboa, 5,2% em Viana do Castelo e 10,3% em Leiria. Destes animais, em pelo menos 53% dos casos a necrópsia foi realizada na totalidade, sendo que nos outros casos a decomposição do corpo não permitiu a realização de necrópsia completa.

Nas necrópsias em que cooperei os animais foram identificados com um código que inclui a espécie e o ano em que arrojaram e é-lhes atribuída uma ficha de necrópsia na qual se registam as biometrias do animal, o sexo, a espécie (sempre que é possível determinar por observação directa), o local onde arrojou e as coordenadas, o tipo de terreno envolvente e as condições em que foi encontrado (Anexo I). São registadas quaisquer marcas externas (pigmentação, cicatrizes, marcas de rede ou cabos, cortes, predação, abrasões ou lacerações, lesões tipo *tattoo*) e os olhos, boca e orifícios genital e anal são observados para detecção de descargas purulentas ou sanguinolentas e lesões tipo couve-flor ou úlceras que, caso existam, são recolhidas. No decorrer da necrópsia são recolhidos materiais para histologia, virologia, genética, toxicologia e qualquer outro material que se considere necessário segundo uma ficha de recolha de material (Anexo II).

Das necrópsias a que assisti no período do meu estágio 73% foram de Golfinhos Comuns (*Delphinus delphis*) sendo esta a espécie que arroja na nossa costa com maior frequência. As outras necrópsias foram de Bôtos (*Phocoena phocoena*) (13%), de Golfinhos Riscados (*Stenella coeruleoalba*) (3%) e apenas 2 animais da espécie *Balaenoptera Acutorostrata* (Baleia anã).

Para além do período em que decorreu oficialmente o meu estágio curricular, assisto e colaboro com a Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem e com o Centro de Reabilitação de Animais Marinhos de Quaias desde 2010, tendo já acompanhado necrópsias em outras espécies animais, como Baleias Comuns e Baleias de Bico de True. Além disso, colaborei em respostas a alertas de arrojamentos vivos, tendo colaborado na recolha e eutanásia de alguns animais que não tinham condições para passarem pelo processo de reabilitação, como foi o caso de uma cria de Baleia de Bico em 2010.

As necrópsias realizadas permitem a determinação de uma série de parâmetros importantes para a caracterização da população de animais arrojados na nossa costa. A determinação da idade é feita pela observação microscópica dos dentes quando estes existem (odontocetes): são recolhidos 5 dentes da zona central da mandíbula inferior esquerda e são colocados num recipiente com tampa com álcool a 70°. São recolhidos outros 5 dentes da mesma zona que são colocados em sacos hermeticamente fechados e congelados a -20°C. São recolhidas amostras de pele, *blubber* e músculo da região dorsal, logo abaixo da barbatana dorsal que são congeladas a -20°C. A pele é recolhida para frascos com tampa e colocada em álcool para análises genéticas. Os órgãos internos são recolhidos e congelados a -20°C e conservados em formol a 10%. Sempre que se observam parasitas na necrópsia estes são recolhidos para identificação e análises toxicológicas respectivamente em álcool e congelados. Os materiais para virologia são recolhidos e conservados em RNA later (Qiagen[®]) e congelados a -20° até serem utilizados.

1.2. Cetáceos na costa portuguesa

A informação sobre os cetáceos que ocorrem nas águas Portuguesas é limitada, sendo maioritariamente classificados como insuficientemente conhecidos (Cabral, et al., 2006). Em Portugal continental estão identificadas pelo menos 19 espécies de mamíferos marinhos, sendo os cetáceos odontocetes os mais frequentes (Teixeira, 1979) e que constituem a totalidade dos animais analisados neste trabalho. A sua distribuição e ocorrência é quase exclusivamente baseada em dados de arrojamentos existindo um registo sistemático dos arrojamentos de mamíferos marinhos, desde 1977, efectuado por entidades oficiais e particulares que depois canalizam os dados para o Instituto da Conservação da Natureza (Sequeira, Inácio, & Reiner, 1992).

No decreto lei 263/81 de 3 de Setembro é referida a importância dos mamíferos marinhos no ecossistema marinho e na manutenção das cadeias alimentares e é sublinhada a necessidade de adoptar medidas de protecção devido ao decréscimo das populações de algumas espécies. Este decreto proíbe a captura intencional e transporte destes animais. A transposição da directiva Habitats para a legislação portuguesa também prevê a protecção de cetáceos em águas portuguesas (decreto lei 140/99 de 24 de Abril com a redacção dada pelo decreto lei 49/2005 de 24 de Fevereiro).

As população de cetáceos que habitam as águas portuguesas sofrem grandes pressões por parte das actividades do Homem, à semelhança do que acontece em outros países. As capturas acidentais em artes de pesca, a poluição e a degradação generalizada dos seus habitats bem como a exploração directa de determinadas espécies ameaçam as populações de cetáceos (Reeves, Smith, Crespo, & Nortobartolo di Sciara, 2003).

Para além de factores extrínsecos há factores intrínsecos que afectam estas espécies como taxas de reprodução baixas, estruturas sociais complexas, entre outros, que os tornam mais vulneráveis às actividades humanas (Simmonds, 1994).

Se tivermos este quadro em consideração podemos compreender que doenças infecciosas associadas a altas taxas de mortalidade, como os morbilivírus, podem ter efeitos devastadores nestas populações pelo que o seu estudo adquire um papel de relevo na protecção destes animais.

O conhecimento acerca das espécies marinhas não é tão vasto como o nosso conhecimento das espécies terrestres; Em alguns casos resulta apenas de dados de arrojamento (Reid, Evans, & Northridge, 2003).

Segundo os dados preliminares divulgados na *newsletter* do projecto Safesea (2010) acerca de arrojamentos em Portugal, entre os anos 2000 e 2009 registaram-se 744 arrojamentos de 13 espécies de cetáceos. Destes, a maioria pertence à ordem Odontocetes, sendo a espécie mais frequente o golfinho-comum com 62,1% dos arrojamentos, seguido do bôto com 12,6%. O golfinho-riscado representa apenas cerca de 3,9% dos arrojamentos. As baleias-piloto e as baleias-de-bico têm percentagens de arrojamento inferiores sendo que as baleias-de-bico (ordem *mesoplodon*) são consideradas ocasionais nas águas continentais portuguesas.

Para compreender o possível impacto que doenças infecciosas ou outras pressões de selecção possam ter nestes animais é importante conhecer a sua ecologia e distribuição.

1.2.1. *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) (Golfinho-riscado).

Imagem 3 - Ilustração representativa de golfinhos riscados (*Stenella coeruleoalba*) (retirado de <http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/>).



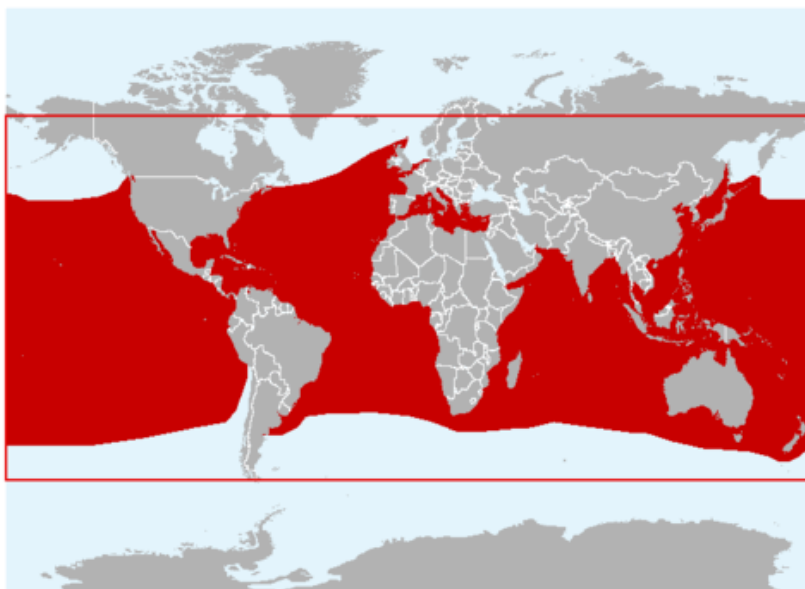
Os Golfinhos-riscados (imagem 1) encontram-se em águas temperadas, subtropicais e tropicais com uma distribuição cosmopolita (imagem 2). São maioritariamente pelágicos viajando em grandes grupos de várias centenas e até milhares de indivíduos (Reyes, 1991).

No NE-Atlântico são geralmente encontrados em águas profundas a mais de 1000 metros de profundidade) para lá da plataforma continental (Perrin, Wilson, & Archer, 1994).

Em termos morfométricos o esqueleto dos golfinhos-riscados sofre apenas variações ligeiras e praticamente nenhuma alteração de cor ou padrão entre as várias localizações geográficas. Há no entanto alterações significativas no tamanho corporal entre populações do Atlântico Norte, do Mediterrâneo Noroeste e do Mediterrâneo Sudoeste (Rice, 1998). Análises ao ADN mitocondrial sugerem que as populações do Atlântico nordeste (NE-Atlântico) e do Mediterrâneo são distintas (García-Martínez, Moya, Raga, & Latorre, 1999). Também Bourret em 2007 sugere que existem diferenciações significativas entre populações do Mediterrâneo e do Atlântico com base em cinco microssatélites.

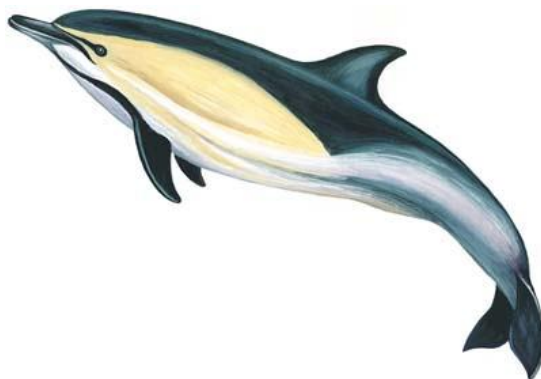
No Mediterrâneo Oeste e Central esta é a espécie de cetáceos mais frequente (Perrin, Wilson, & Archer, 1994 e Reyes, 1991). Após o surto de DMV dos anos noventa a população estimada nesta zona era de 225000 indivíduos e na zona da Baía de Biscaia a população estimada em 1993 era de 74000 indivíduos (Goujon, 1996).

Imagem 4 - Mapa da distribuição mundial da espécie *Stenella coeruleoalba* (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).



1.2.2. *Delphinus delphis* (Linnaeus, 1758) (Golfinho comum).

Imagem 5 - Ilustração representativa de um golfinho comum (*Delphinus delphis*) (retirado de <http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/>).



No que diz respeito aos golfinhos comuns (imagem 3) estes têm uma distribuição vasta mas descontinuada em águas tropicais e temperadas do Atlântico, Pacífico e Índico (imagem 4).

A sua distribuição total é incerta devido ao facto de a sua classificação taxonómica ter sido alvo de bastante controvérsia durante muitos anos.

A variedade de fenótipos das espécies do género *Delphinus* levou a que ao longo dos anos mais de 20 espécies fossem propostas (Carwardine, 1995). Hoje, considera-se que este género tem pelo menos duas espécies: o golfinho-comum de bico curto que tem uma distribuição maioritariamente *offshore* (*D. delphis*) e o golfinho-comum de bico comprido (*D. capensis*) que habita maioritariamente águas costeiras.

O golfinho-comum é geralmente encontrado onde as temperaturas da água à superfície estão entre 10 e 20°C.

Imagem 6 - Mapa da distribuição mundial da espécie *Delphinus delphis* (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).



1.2.3. *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758) (Bôto).

Imagem 7 - Ilustração representativa de um bôto (*Phocoena phocoena*) (retirado de <http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/>).



Os bôtos (imagem 5) são encontrados em águas de climas temperados frios e subpolares do hemisfério norte (Jefferson, Leatherwood, & Webber, 1993).

Segundo um estudo realizado por Rosel, Tiedemann, e Walton (1999) que examinou ADN mitocondrial de bôtos em várias áreas do Atlântico estes animais parecem não se movimentar muito ao longo do Atlântico. Os bôtos estão limitados a águas costeiras da plataforma continental com temperaturas médias geralmente superiores a 17°C (imagem 6). Encontram-

se normalmente em grupos pequenos de menos de oito animais mas podem agrupar-se em grupos de 50 ou de algumas centenas de animais para migrações ou para se alimentarem (Jefferson, Leatherwood, & Webber, 1993). Esta espécie não é geralmente encontrada em associação com outros cetáceos.

Imagem 8 - Mapa da distribuição mundial da espécie *Phocoena phocoena* (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).



1.2.4. *Globicephala melas e macrorhynchus* (Traill, 1809) - *Globicephala* sp. (Baleia piloto).

Imagem 9 - Ilustração representativa de baleias piloto (*Globicephala melas*) (retirado de <http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/>).



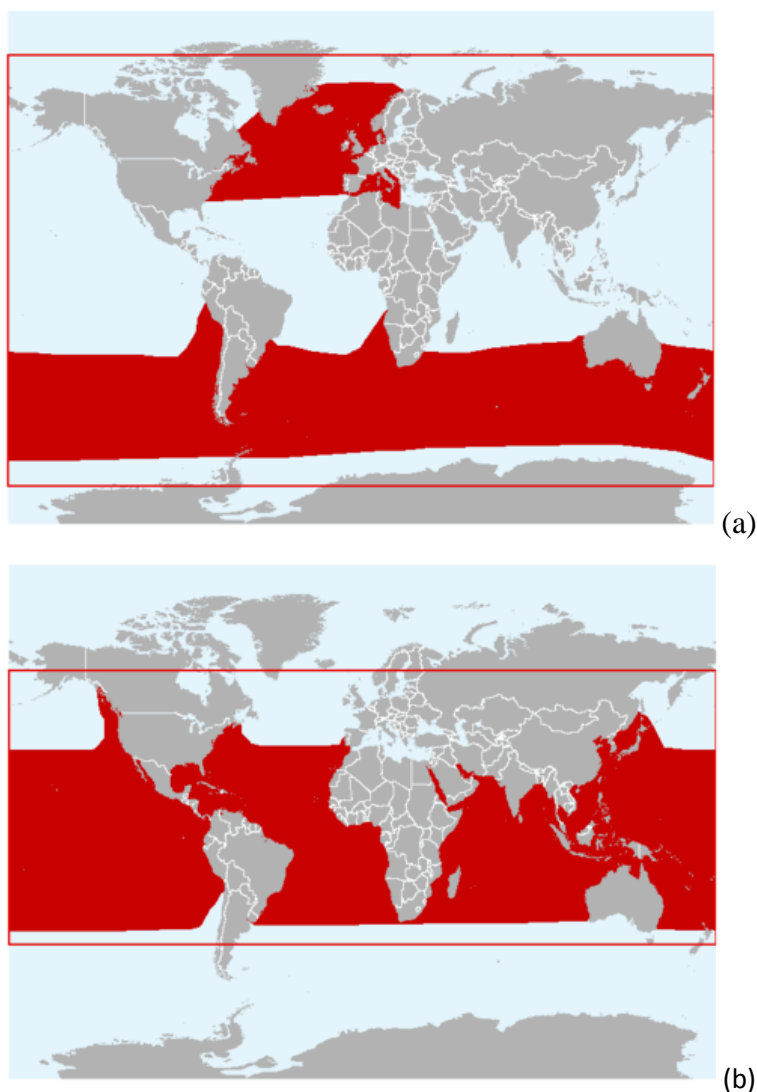
As baleias-piloto (imagem 7) são dos maiores membros da família *Delphinidae*.

As *Globicephala melas* habitam águas temperadas frias do Atlântico Norte e Sul em duas populações que se incluem em duas subespécies: *G. melas melas* no Atlântico Norte e *G. melas edwardii* no hemisfério Sul (imagem 8).

Esta espécie é nómada e pode ser encontrada tanto em águas costeiras como em ambiente pelágico. Movimentam-se em grupos de 20 a 90 animais e podem agregar-se a outras espécies com frequência, como por exemplo a roazes, golfinhos-comuns e golfinhos-riscados.

No mar, é difícil distinguir a baleia-piloto de barbatanas longas (*G. melas*) das de barbatanas curtas também conhecida como baleia-piloto tropical (*G. macrorhynchus*).

Imagem 10 - Mapa da distribuição mundial da espécie *Globicephala melas* (a) e *Globicephala macrorhynchus* (b), respectivamente (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).



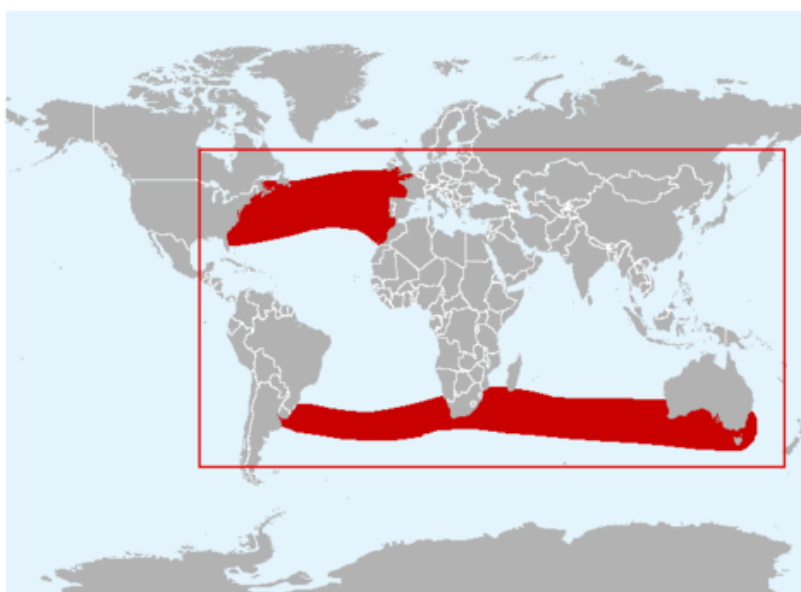
1.2.5. *Mesoplodon mirus* (True, 1913) (Baleia-de-bico).

Imagem 11 - Ilustração representativa de uma baleia de bico de True (*Mesoplodon mirus*) (retirado de <http://www.iim.fh-koeln.de/webterm/deuterm/WaleEDS/>).



Pertencente ao género *Ziphius*, a baleia-de-bico de True (imagem 9) distribui-se no Atlântico Norte e Sul e no Sul do Oceano Índico (imagem 10). O conhecimento acerca desta espécie é escasso e provém na sua maioria da análise dos arrojamentos. É provavelmente uma espécie pelágica mas pode ser encontrada em águas costeiras (Houston, 1990). O facto de serem animais pelágicos pode ser o motivo pelo qual há tão poucos avistamentos e arrojamentos desta espécie.

Imagem 12 - Mapa da distribuição mundial da espécie *Mesoplodon mirus* (retirado de http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/).



1.3. Morbilivírus

1.3.1 Caracterização

O género morbilivírus pertence à família *Paramyxoviridae*, pertencente à ordem *Mononegavirales*. A família *Paramyxoviridae* divide-se em duas subfamílias: *Pneumovirinae* e *Paramyxovirinae*, estando os morbilivírus incluídos nesta última. Há ainda mais quatro géneros que se inserem nesta subfamília: *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Henipavirus* e *Avulavirus*.

Os morbilivírus causam doença severa a diversas espécies animais (tabela 1).

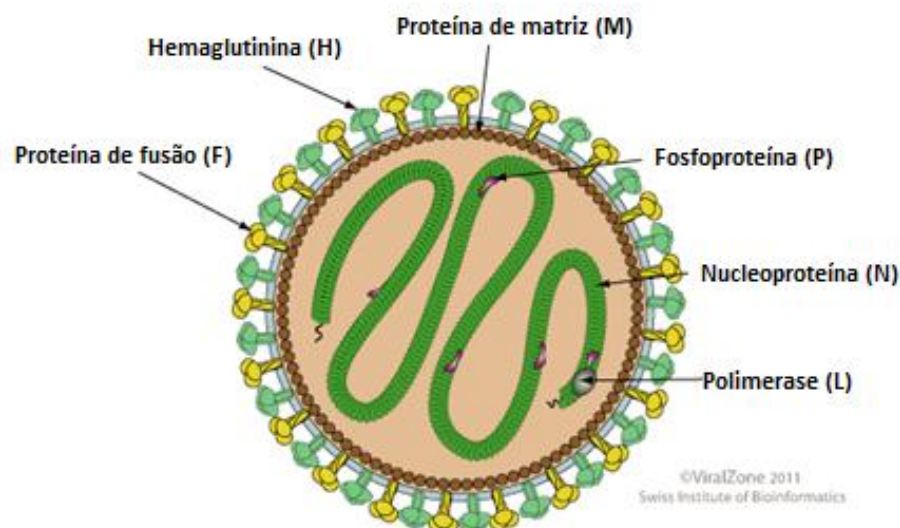
Tabela 1- Espécies susceptíveis aos morbilivírus e doença causada (Adaptado de Fenner Veterinary Virology).

<i>Paramyxovirinae/Morbillivirus</i>		
Peste dos Ruminantes (RPV)	Gado, ruminantes selvagens	Doença generalizada severa.
Peste dos Pequenos Ruminantes (PPRV)	Ovelhas e cabras	Doença generalizada severa.
Esgana (CDV)	Cães e membros das famílias Procyonidae, Mustelidae e Felidae	Doença generalizada severa com alterações do sistema nervoso central.
Vírus da esgana das focas (PDV)	Focas e leões marinhos	Doença generalizada severa com sintomatologia respiratória.
Morbilivírus dos Cetáceos (CeMV)	Golfinhos e botos	Doença generalizada severa com sintomatologia respiratória
Morbilivírus bovino (MV-K1)	Gado	Mal caracterizado.
Sarampo (MV)	Humanos	Doença generalizada severa com sintomatologia respiratória e do sistema nervoso central.

Os viriões dos morbilivírus são pleomórficos geralmente esféricos com cerca da 150 nm de diâmetro com um involucro lipídico composto por 2 glicoproteínas (H e F) posicionadas no exterior, que regulam a entrada e saída do virião das células hospedeiras, e proteínas não glicosiladas no interior (imagem 11). Estas glicoproteínas (H e F) têm entre 9 e 15 nm de comprimento e estão espessadas entre si de 7 a 10 nm (Knipe & Howley, 2001).

Dentro do invólucro encontra-se a nucleocápside helicoidal formada pelas as proteínas N, P e L que iniciam a replicação viral intracelular . O genoma dos Paramixovírus é constituído por ARN de cadeia simples com sentido negativo cuja replicação ocorre no citoplasma.

Imagem 13 - Representação esquemática de um virião de morbilivírus (Adaptado de Fenner Veterinary Virology).



O virião liga-se aos receptores da membrana citoplasmática da célula alvo utilizando para isso as glicoproteínas de superfície e depois dá-se a fusão deste com a célula alvo.

A proteína F é a responsável por mediar a ligação entre a membrana citoplasmática e a cápside viral, permitindo a entrada das proteínas internas e da nucleocápside do vírus para o citoplasma.

A síntese viral compreende a formação de proteínas estruturais e não estruturais a partir dos processos de transcrição e tradução (tabela 2). Nos morbilivírus este processo ocorre no

citoplasma. O ARN viral é transcrito em mARN's pelo complexo de transcriptase viral e as proteínas virais são produzidas por unidades de tradução celular.

Finalmente, a sequência é replicada inteiramente. Este ARN é então encapsidado por nucleoproteínas recém-sintetizadas e há a formação de viriões completos por um processo de "*budding*" da membrana celular e estes viriões recém formados infectam novas células.

A glicoproteína H (hemaglutinina) dos morbilivírus funciona como uma proteína de ligação, sem actividade neuraminidase. A outra glicoproteína de superfície, F ou de fusão, é sintetizada como um precursor inactivo que tem de ser clivado pelas proteases da célula hospedeira para promover a fusão do virião com a membrana citoplasmática, o que permite a entrada da nucleocápside no citoplasma. A proteína F é então também expressa na membrana citoplasmática das células infectadas provocando a fusão com células vizinhas, levando ao aparecimento de células gigantes multinucleadas (células sinciciais), observadas em cortes histológicos de tecidos de animais infectados com o vírus.

A proteína N tem dois domínios: o N-terminal e o C-terminal. No extremo 3' há um grupo amina (NH₂) livre que constitui aproximadamente 80% da proteína (N-terminal), que é considerada uma região bem conservada. Pelo contrário, o extremo 5' que tem um grupo carboxilo livre (C-terminal) não é conservado sendo considerado uma região hipervariável.

Os mARN do gene P são traduzidos em duas proteínas não estruturais (V e C). A proteína P é a única das três que é estrutural e essencial para a síntese de ARN viral (Curran, Marq, & Kolakofsky, 1992 e Knipe & Howley, 2001).

O gene V é expresso por todos os morbilivírus e localiza-se no interior do gene P. As proteínas acessórias V e C têm um papel na regulação da síntese de ARN viral e no combate às defesas do hospedeiro à infecção viral.

A proteína M é considerada crítica na morfogénese viral interagindo com o invólucro lipídico e com as glicoproteínas de superfície H e F (Knipe & Howley, 2001).

A proteína L (large) é a menos abundante pois é a última a ser transcrita uma vez que se localiza na terminação 5' do genoma. É considerada uma proteína estrutural pois em conjunto com a P e N formam o complexo ribonucleoproteico. É uma proteína muito grande, com cerca de 2200 aminoácidos (imagem 12).

Imagem 14 - Representação esquemática do viri3o dos morbiliv3rus com as glicoprote3nas que o constituem e do seu genoma (adaptado de <http://viralzone.expasy.org>). A Transcri33o viral ocorre num gradiente, devido 3 actividade da RNA polimerase que transcreve os genes localizados no extremo 3'do genoma em maiores quantidades do que os genes localizados no extremo 5'.

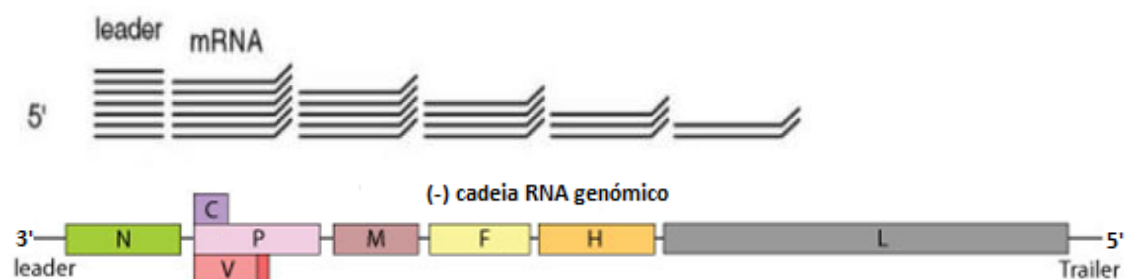


Tabela 2- Glicoprote3nas que constituem os morbiliv3rus e suas fun33es.

Prote3na viral	Fun33o
H	Hemaglutinina: Prote3na de liga33o, indu33o de imunidade.
L e P/C/V	Transcriptase: transcri33o do ARN gen3mico.
N	Nucleoprote3na: protec33o do ARN gen3mico.
F	Prote3na de fus3o: fus3o celular, penetra33o viral, infec33o de c3lulas vizinhas, indu33o de imunidade.
M	Prote3na de matriz: estabilidade viral.

1.3.2. Epidemiologia

At3 1987 pensava-se que o v3rus da esgana (CDV) infectava naturalmente apenas as fam3lias *Canidae*, *Ursidae*, *Mustelidae*, *Viverridae* e um membro da ordem Artiodactyla (Barrett, Pastoret, & Taylor, 2006). No in3cio dos anos 90 o CDV foi tamb3m isolado nos *Felidae* e *Hyaenidae* (Haas, Subbarao, Harder, Liess, & Barrett, 1991) aumentando a gama de hospedeiros conhecida.

A primeira evidência de que um vírus semelhante ao vírus da esgana do cão (CDV) seria responsável por mortalidade elevada em mamíferos marinhos observou-se em 1988 em focas comuns de populações do Mar do Norte e Mar Báltico, nas quais foram detectados anticorpos anti-CDV enquanto se encontravam num centro de reabilitação e pesquisa em Pieterburen (Holanda). O vírus detectado foi denominado Phocid distemper vírus-1 (PDV-1) após se demonstrar que era distinto do CDV apesar de se relacionar antígenicamente com este (Visser, et al., 1990).

Estudos efectuados em animais da espécie *Phoca sibirica* (foca-do-Baikal) mortos no lago Baikal no ano de 1987 associaram estas mortes a um morbilivírus semelhante ao CDV (Osterhaus, et al., 1989). Neste estudo por Osterhaus o vírus encontrado foi denominado de Phocid distemper vírus-2 (PDV-2) que era antígenicamente mais próximo do CDV do que o PDV-1.

Já em 1955 mortalidades elevadas entre membros da espécie *Lobodon carcinophagus* (foca-caranguejeira) na Antártica devidas a um surto de pneumonia infecciosa foram relacionadas com o vírus da esgana através de dados serológicos retrospectivos, sugerindo a possibilidade da introdução do vírus nesta espécie através de cães de trenó da zona (Bengston, Boveng, Have, Heide-Jorgensen, & Harkonen, 1991).

A mortalidade em animais infectados varia muito entre espécies sendo que os furões têm uma taxa de mortalidade de aproximadamente 100% enquanto cães domésticos têm uma taxa de mortalidade de cerca de 50-60%.

A existência de reservatórios para os morbilivírus marinhos não está esclarecida mas as focas cinzentas (*Halichoerus grypus*) têm sido apontadas como possíveis reservatórios. Estas teorias surgem do facto de esta espécie se apresentar frequentemente como portadora do vírus sem no entanto ser significativamente afectada por este. O facto de estes animais terem padrões migracionais longos, cruzando-se no seu trajecto com populações mais sedentárias de focas comuns (*Phoca vitulina*) pode ter um papel fundamental na propagação do vírus e no seu contacto com populações não imunes ou previamente expostas (Harkonen, et al., 2006 e Barrett, Blixenkrone-Moller, Di Guardo, Dorrington, & Duignan, 1995).

Num estudo efectuado por Duignan em 1997 em animais de vida livre as focas cinzentas tinham títulos de Ac significativamente mais altos do que as focas comuns o que parece estar em concordância com os estudos que sugerem uma maior imunidade nesta espécie.

Em cetáceos, as primeiras indicações da existência de infecções por morbilivírus resultaram da detecção de antígeno em órgãos de bôto (*Phocoena phocoena*) que arrojaram nas costas

da Irlanda durante o surto de PDV-1 de 1988. Este agente foi denominado Porpoise morbillivirus (PMV) (Kennedy, Smyth, McCullough, Allan, & McQuaid, 1988 e McCullough, et al., 1991).

Também nos anos de 1987-1988 se verificou um aumento de mortalidade superior em cerca de dez vezes o normal em roazes (*Tursiops truncatus*) na costa dos Estados Unidos, de New Jersey à Florida, associada a infecção por morbillivírus – Dolphin Morbillivírus (DMV) (Lipscomb, Schulman, Moffett, & Kennedy, 1994).

Em 1990 foi detectada infecção por DMV em golfinhos riscados no Mediterrâneo (Van Bresse, Visser, Van de Bildt, Teppema, Raga, & Osterhaus, 1991). Detectados primeiro na costa espanhola, centenas de golfinhos morreram de uma doença caracterizada por pneumonia e encefalite (Domingo, et al., 1992). Posteriormente, estas mortes foram também detectadas nas costas de França, Itália e Marrocos (Aguilar, 1990).

Outros surtos de morbilivírus em cetáceos foram entretanto detectados noutras partes do mundo: nos anos de 1993-94 no Golfo do México, mortes em roazes foram atribuídas a uma epidemia de morbilivírus (Lipscomb, et al., 1996); ainda em 1994, na margem norte do Mar Negro, golfinhos comuns (*Delphinus delphis ponticus*) arrojavam em maior número do que nos anos anteriores e este aumento de mortalidade foi atribuído a surto de morbilivírus por Birkun et al em 1999.

Actualmente são reconhecidos três morbilivírus que afectam os mamíferos marinhos: CeMV (cetacean morbillivirus), que reúne o PMV e o DMV sob a mesma denominação, que afecta golfinhos e botos (Barrett, Visser, Mamaev, Goatley, Van Bresse, & Osterhaus, 1993); o PDV que afecta pinípedes e o CDV que afecta pinípedes e ursos polares (Garner, Evermann, Saliki, Follmann, & McKeirnan, 2000 e Follmann, Garner, Evermann, & McKeirnan, 1996).

Os três estão genética e antígenicamente relacionados havendo reacções cruzadas entre eles.

Apesar do impacto dos morbilivírus nos mamíferos marinhos a ecologia do vírus ainda não é inteiramente conhecida e a existência de vectores e reservatórios tem de ser mais estudada.

A transmissão horizontal é a mais frequente, especialmente se tivermos em consideração o comportamento social dos mamíferos marinhos, que vivem em grupo e que contactam socialmente entre si e com outras espécies. Apesar de não haver estudos suficientes para determinar o grau de transmissão vertical já se detectaram anticorpos anti-CDV de origem materna em crias de foca cinzenta (Carter, Hughes, Taylor, & Bell, 1992).

Em estudos efectuados por Kondratov e colaboradores em 2003 na fauna do lago Baikal na Sibéria, detectou-se um morbilivírus em gastrópodes das espécies *Baicalia carinata* e

Lymnaea auricularia. Após detecção por RT-PCR e sequenciação do gene P demonstrou-se que este vírus é semelhante ao CDV e teorizou-se a possibilidade de estes gastrópodes actuarem como reservatórios de morbilivírus para os animais marinhos dessa área.

Alguns autores sugerem que as baleias piloto (*Globicephala spp.*), por se encontrarem em praticamente todos os oceanos e por terem rotas migratórias muito vastas movendo-se em grandes grupos e contactando com muitas outras espécies de cetáceos possam servir de fonte enzoótica para os CeMV (Taubenberger, et al., 2000 e Barrett, Pastoret, & Taylor, 2006). Entre os anos de 1982 e 1993 houve vários episódios de arrojamentos em massa de baleias piloto no Atlântico Oeste dos quais mais de 90% foram positivas para anticorpos anti-CeMV (Duignan et al 1995 e Barrett et al 1995a). Dados de PCR relativos aos genes P e N dos morbilivírus sugerem que o vírus detectado em baleias-piloto seja uma outra variante do CeMV (Taubenberger, et al., 2000).

Todos os membros deste género (morbilivírus) requerem populações numerosas para que possam ser mantidos endemicamente (Black, 1991) e geralmente a transmissão ocorre por contacto directo entre animais infectados e animais que nunca foram expostos ao vírus (Barrett, 1999 e Knipe & Howley, 2001).

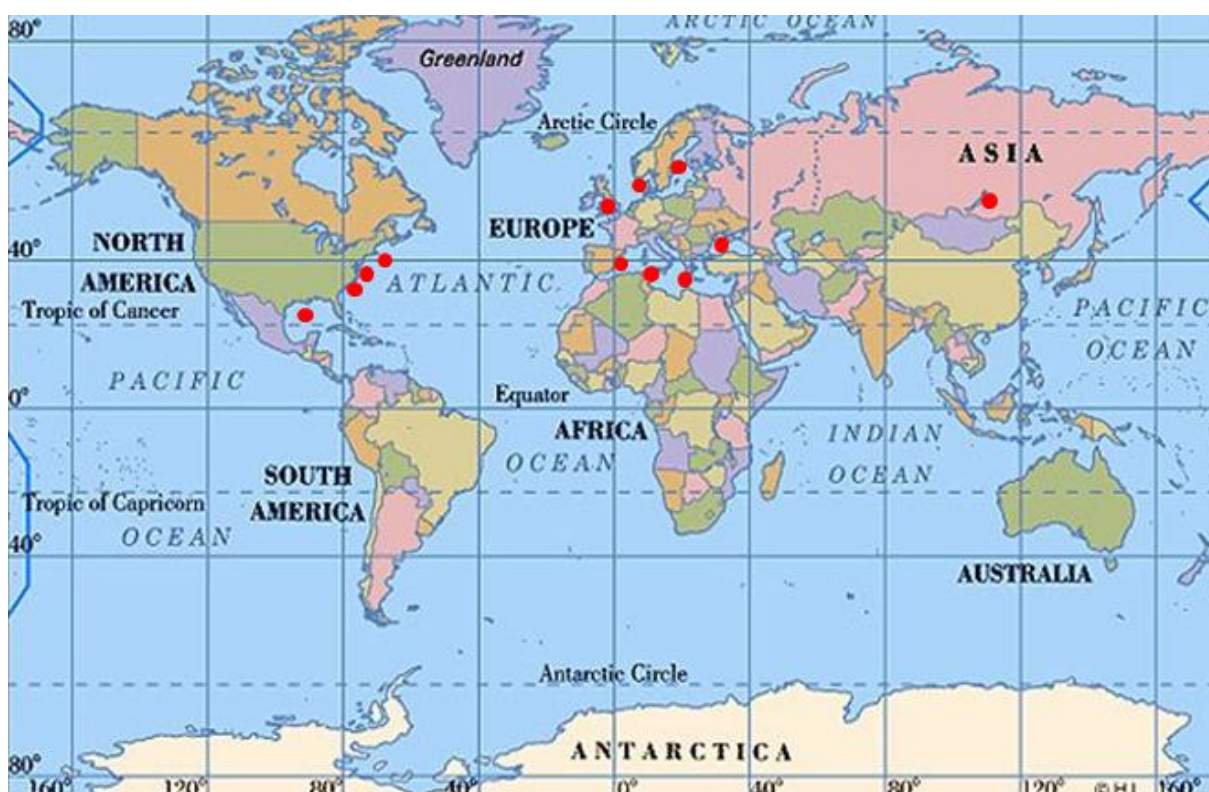
Foi sugerido por Van Bresseem em 1999 que a interacção sinérgica entre a pressão exercida pelas artes de pesca e pelos surtos de morbilivírus em mamíferos marinhos pode reduzir significativamente o número de indivíduos de algumas populações, aumentando assim o risco de extinção de algumas espécies.

Outras influências ambientais agravam este quadro uma vez que altos níveis de organoclorados em mamíferos marinhos estão associados à redução da resistência imunitária podendo contribuir para o agravamento de surtos de morbilivírus (Aguilar & Borrel, 1995). As populações de cetáceos sofrem altas mortalidades em capturas acidentais e são bioacumuladores, apresentando níveis altos de contaminantes (Aguilar & Borrel, 1995), (Silvani, Gazo, & Aguilar, 1999) o que as colocando numa posição de alto risco para a infecção com morbilivírus.

Estudos serológicos em 2001, mostraram uma diminuição da prevalência de Golfinhos-riscados seropositivos a CeMV no Mediterrâneo depois da epidemia do início dos anos noventa (Van Bresseem) o que sugeria que este vírus não estaria endémico nesta população. No mesmo estudo por Van Bresseem et al (2001) os dados sugerem que as populações de botos e de golfinhos-comuns do Atlântico Nordeste e do Mar do Norte estariam a perder imunidade ao CeMV colocando-os em risco no caso de reintrodução viral.

De facto, depois do surto dos anos noventa no Mediterrâneo, a imunidade das populações de riscados baixou permitindo nova reintrodução viral que se verificou em 2007 quando, só na costa espanhola, arrojaram mais de cem golfinhos riscados. Por RT-PCR e sequenciação do gene N concluiu-se que este vírus era muito semelhante ao vírus da epidemia de 1990 (Raga 2008). Neste momento surgem novas informações que sugerem que um novo surto esteja a ocorrer (2011) uma vez que há relatos de golfinhos-riscados arrojados na zona de Valência (Espanha) que são positivos a CeMV. Os eventos mais importantes na história dos morbilivírus referidos no texto estão representados num mapa mundial na imagem 13.

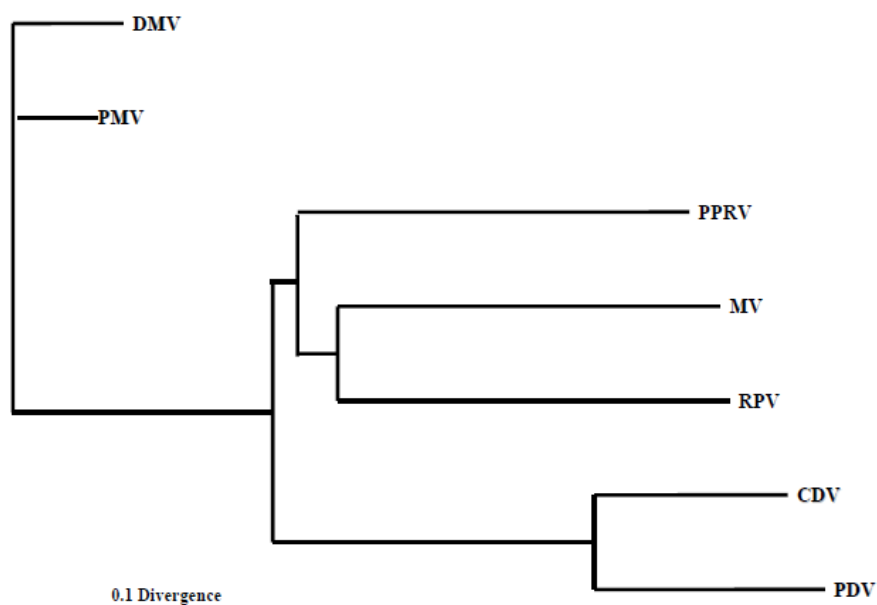
Imagem 15 - Mapa mundial com identificação dos eventos mais importantes na história dos morbilivírus que afectam animais marinhos: Lago Baikal, Mar do Norte, Mar Báltico, Irlanda, Costa este dos EUA, Golfo do México, Mediterrâneo e Mar Negro.



Os isolados de DMV e PMV dos surtos da década de 90 foram inicialmente caracterizados contra um painel de anticorpos monoclonais para o CDV e PDV e mais tarde em ELISAs e imunofluorescência indirecta para demonstrar que eram semelhantes mas distintos do PDV e do CDV (Barrett, Visser, Mamaev, Goatley, Van Bresse, & Osterhaus, 1993), (McCullough, et al., 1991). Mais tarde, análises filogenéticas colocam o DMV e PMV mais próximo dos morbilivírus terrestres como o RPV, PPRV e MV do que do CDV e PDV (Bolt & Blixenkrone-Moller, 1994) (imagem 13).

Em 2000, Jauniaux et al confirmou pela primeira vez a presença de morbilivírus em baleia-comum (*Balenoptera physalus*) arrojadas em 1997, confirmando molecular e patogenicamente a infecção por morbilivírus em mysticetes.

Imagem 16 - Árvore filogenética baseada na análise de sequências de regiões altamente conservadas do gene P dos diferentes morbilivírus. (Retirado de Grant 2008).



1.3.3 Patogénese

Os morbilivírus são transmitidos por aerossol e estudos realizados por vários autores indicam que se estabelecem inicialmente no aparelho respiratório (Knipe & Howley, 2001 e von Messling, Milosevic, & Cattaneo, 2004).

Estudos recentes utilizando um vírus recombinante de uma estirpe virulenta de CDV marcado com uma proteína (proteína verde fluorescente) que permite detectar e seguir a progressão do vírus em furões infectados levaram ao desenvolvimento de uma teoria diferente (von Messling, Milosevic, & Cattaneo, 2004). Neste estudo, demonstrou-se que o CDV se estabelece primeiro no tecido linfático da cavidade oral onde se replica de forma eficiente. O vírus segue depois para os linfonodos locais onde continua a ocorrer a amplificação que resulta em linfócitos infectados que transportam o vírus a vários órgãos. Ao ser transportado pelos linfócitos circulantes ocorre virémia e o vírus infecta monócitos circulantes (von Messling, Milosevic, & Cattaneo, 2004 e Yanagi, Takeda, & Ohno, 2006).

A infecção do aparelho respiratório foi descrita apenas mais tarde na infecção, juntamente com a infecção da pele, conjuntiva, aparelho gastrointestinal, fígado, rim e mucosa genital (Sakaguchi, Yoshikawa, Yamanouchi, Takeda, & Sato, 1986; Hall, Kovatch, Herman, & Fox, 1971; Paterson & Lamb, 1990 e Kobune, et al., 1996).

Em infecções severas, a arquitectura do baço e linfonodos pode estar parcialmente destruída assim como nas placas de *Peyer* e tonsilas, indicando que a imunidade das mucosas (IgA) pode estar comprometida (von Messling, Milosevic, & Cattaneo, 2004).

A infecção por morbilivírus deixa os animais mais susceptíveis a agentes patogénicos oportunistas (Heany, Barrett, & Cosby, 2002). Em cetáceos, sinais de imunossupressão foram descritos à semelhança do que ocorre na patogénese clássica dos morbilivírus.

A excreção viral em animais infectados com CDV pode durar até 60-90 dias e os sinais clínicos são os tipicamente encontrados em infecções por outros morbilivírus: dispneia, anorexia, diarreia, descargas oculares mucopurulentas, encefalite e letargia (Deem, Spelman, Yates, & Montali, 2000).

As glicoproteínas de superfície (H e F) vão desencadear a formação de anticorpos neutralizantes no organismo, enquanto os anticorpos não neutralizantes são geralmente produzidos contra as restantes proteínas virais que se encontram dentro da cápside viral, especialmente contra a proteína N (Santibanez, et al., 2005).

Num estudo por Graves em 1984, em infecção natural em humanos os anticorpos anti proteína H são os segundos mais abundantes, sendo os anticorpos anti-proteína N os que surgem em maior número.

1.3.4 Patologia, sinais clínicos e diagnóstico

Inicialmente a replicação viral ocorre no tecido linfóide das tonsilas, linfonodos e baço, o que coincide com virémia, pirécia e leucopénia severa (Harder, Willhaus, Frey, & Liess, 1990).

O vírus continua a replicar-se no tecido linfóide disseminando-se associado a linfócitos e macrófagos até à pele e mucosas, sistema nervoso central, sistemas respiratório, gastrointestinal e urogenital podendo acompanhar-se de períodos febris. Infecções bacterianas

secundárias resultam geralmente em broncopneumonias supurativas e as cargas parasitárias são elevadas.

Pode ainda haver gengivite e estomatite ulcerativa em animais infectados. Infecções fúngicas por *Aspergillus fumigatus* (Domingo, et al., 1992) ou por toxoplasma (Inskeep, Gardiner, Harris, Dubey, & Goldaton, 1990) podem agravar a situação resultando em encefalites hemorrágicas necrosantes.

Os morbilivírus, especialmente o CDV podem infectar muitas espécies sem causarem necessariamente doença clínica (Kennedy-Stoskopf, Stoskopf, Eckhaus, & Strandberg, 1999). Em cetáceos na Natureza não se observam geralmente sinais clínicos uma vez que estes animais têm pouco contacto com o Homem. Fraca condição corporal e grande quantidade de ectoparasitas, comportamento anormal e dispneia podem ser observados (Aguilar & Raga, 1993 e Calzada & Aguiar, 1995). Em baleias-piloto arrojadas com doença clínica os sinais observados foram anorexia e leucopenia (Duignan, et al., 1995b).

Em golfinhos-comuns do Mar Negro os sinais incluíram letargia e incoordenação com os animais a flutuarem até à costa e aumento das frequências cardíaca e respiratória (Birkun, Kuiken, & Krivokhizhin, 1999). Estes animais apresentavam também leucopénia.

Nas necrópsias, os achados mais frequentes em cetáceos e pinípedes são broncopneumonia e alveolite e os pulmões apresentam-se edematosos com áreas de enfisema e consolidação.

Histologicamente observa-se pneumonia broncointersticial com congestão, edema, exsudado serofibrinoso nos alvéolos, proliferação de pneumócitos tipo II e células sinciciais. Os sincícios e inclusões intracitoplasmáticas e/ou intranucleares acidófilas são mais frequentes em cetáceos do que em pinípedes.

O SNC, mais frequentemente o cerebelo, também pode estar afectado, podendo observar-se necrose neuronal, gliose, *cuffing* perivascular, desmielinização com astrocitose e sincícios. Em infecções agudas a depleção linfóide é muito marcada.

Na epidemia de 1990 no Mediterrâneo, observaram-se dois padrões de infecção: o primeiro foi sistémico, com infecção multiorgânica com danos primários no pulmão, tecido linfóide e sistema nervoso central e o segundo consistiu em lesões localizadas no sistema nervoso central, sem lesões ou antígeno viral presente em tecidos extraneurais (Domingo, Vilafranca, Visa, Prats, Trudgett, & Visser, 1995). Em fases iniciais de infecção fêmeas gestantes podem abortar (Heide-Jorgensen & Harkonen, 1992)

O diagnóstico passa pela identificação das lesões histológicas mencionadas e da demonstração do antígeno viral no tecido lesado por imunohistoquímica ou imunofluorescência. A realização de provas de ELISA em homogeneizado de tecido também pode ser realizada, e

títulos crescentes no soro são utilizados para confirmar infecção clínica. A medição do título de IgM pode ser útil, porque sugere a presença de infecção recente. O diagnóstico molecular por detecção de RNA viral através de PCR pode ser efectuado a partir de amostras de tecido frescas ou previamente fixadas em formol.

2 Materiais e Métodos

2.1. Amostras e seu processamento

Para a realização deste estudo retiraram-se amostras de tecido a 40 animais arrojados na costa portuguesa aos quais foram realizadas necrópsias segundo os protocolos existentes (Kuiken & Hartmann, 1991; Geracy, 1993 e Rowles, Van Dolah, & Hohn, 2001). Dos 40 animais utilizados neste estudo estão incluídos *Delphinus delphis* (Golfinho-comum); *Stenella coeruleoalba* (Golfinho-riscado), *Globicephala melas e macrorhynchus* (Baleias-piloto), *Phocoena phocoena* (Bôto) e *Mesoplodon mirus* (Baleia de bico de True) (tabela 3). As amostras estão identificadas ao longo deste trabalho por um código que inclui as iniciais das espécies (DD, SC, GM, PP e Mm) um número atribuído ao arrojamento e o ano.

Tabela 3 - Espécies e número de animais utilizados neste trabalho.

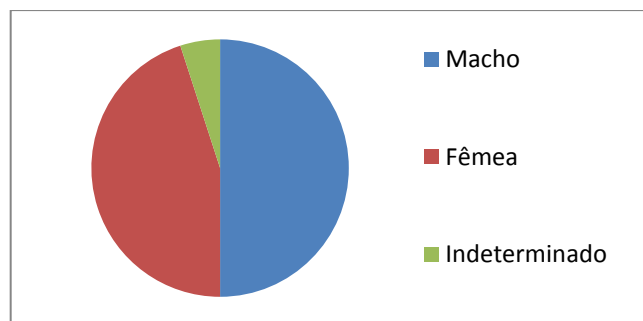
Espécie	Número
<i>Delphinus delphis</i> (Golfinho-comum)	25
<i>Stenella coeruleoalba</i> (Golfinho-riscado)	8
<i>Globicephala sp.</i> (Baleia-piloto)	4
<i>Phocoena phocoena</i> (Bôto)	2
<i>Mesoplodon mirus</i> (Baleia de bico de True)	1
TOTAL	40

Destas, 30 necrópsias foram realizadas entre o início de Março e o fim de Maio de 2011. O restante material utilizado foi recolhido em necrópsias realizadas entre 2004 e 2009), de forma a incluir todas as amostras disponíveis relativas a animais arrojados vivos ou muito frescos das espécies *Stenella coeruleoalba* e *Globicephala sp.*.

As amostras consistiram sempre que possível em fragmentos de pulmão e de cérebro armazenados em tubos contendo 1 mL de RNA Later para posterior extracção de ARN viral.

Para a detecção de anticorpos foram utilizados fragmentos de pulmão previamente congelados a -20°C ou a -80°. Foram colhidos fragmentos de maiores dimensões que foram fixados em formol a 10% para exame histológico.

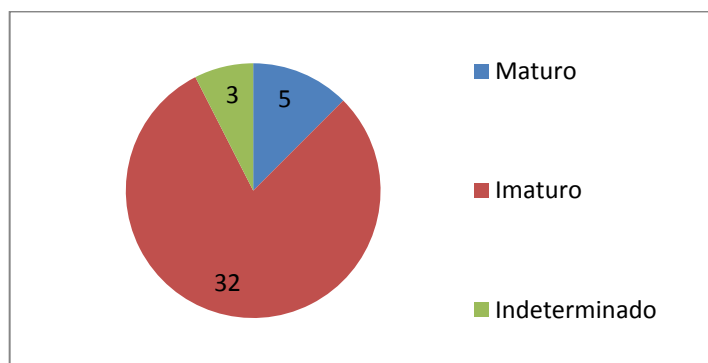
Imagem 17 - Distribuição por sexos dos animais utilizados neste trabalho.



Das 40 amostras recolhidas utilizadas neste trabalho 18 animais são fêmeas e 20 são machos, havendo 2 animais nos quais o sexo não foi identificado (imagem 14). Sempre que possível estes animais foram classificados quanto à maturidade sexual.

No caso das fêmeas esta observação é feita aquando da necrópsia, através da observação da presença ou ausência de *corpus albicans* para todas as espécies. Nos machos, consideraram-se os comuns com menos de 1,80 m imaturos sexualmente uma vez que há estudos que indicam que o comprimento médio de golfinhos-comuns aquando da maturidade sexual é de cerca de 2 m (Perrin & Reilly, 1984). Nas restantes espécies analisadas em 2011 não se inferiu maturidade e nos animais de anos anteriores foi utilizada informação disponível (por observação microscópica dos testículos para determinação da maturidade sexual) (Imagem 15).

Imagem 18 - Maturidade sexual dos animais utilizados neste trabalho.



2.3 Extracção de ARN e detecção de antígeno

A extracção de ARN total foi efectuada com o kit comercial DNEasy Blood and Tissue (Qiagen, Alemanha), - de acordo com as instruções do fabricante. Fragmentos de 2mm de diâmetro de pulmão e/ou cérebro foram homogenizados em 400 µL de tampão de lise celular ATL após adição de 80 µL de proteinase K as amostras foram incubadas a 56°C até obtenção de uma suspensão homogénia. Os ácidos nucleicos foram posteriormente precipitados na presença de 400 µL do tampão desnaturante AL e 400 µL de etanol e adsorvidos a uma coluna de purificação.

Após duas lavagens com os tampões apropriados, os ácidos nucleicos foram eluídos com o tampão aquoso AE e quantificados no Nanodrop 2000C (Thermo Scientific).

Tabela 4 - Listagem de amostras utilizadas neste trabalho (ano, espécie e materiais utilizados) e quantificação de ARN total e dos volumes necessários para uma reacção de 50 ng.

Amostra	Ano	Espécie	Materiais	Concentração Ác. Nuc.
125	2011	DD	Cérebro+pulmão	118,3 ng/µL
126	2011	DD	Cérebro+pulmão	103,3 ng/µL
127	2011	DD	Cérebro+pulmão	295 ng/µL
128	2011	DD	Cérebro+pulmão	272,2 ng/µL
129	2011	DD	Cérebro+pulmão	86,2 ng/µL
130	2011	DD	Cérebro+pulmão	154 ng/µL
132	2011	DD	Cérebro+pulmão	127,2 ng/µL
133	2011	DD	Pulmão	120,7 ng/µL
31	2011	Mmi	Cérebro+pulmão	8 ng/µL
134	2011	DD	Pulmão	46,6 ng/µL
137	2011	DD	Cérebro+pulmão	79,2 ng/µL
141	2011	DD	Cérebro+pulmão	105,5 ng/µL
156	2011	DD	Cérebro+pulmão	89,7 ng/µL
159	2011	SC	Cérebro+pulmão	91 ng/µL
160	2011	DD	Cérebro	79 ng/µL
162	2011	DD	Cérebro+pulmão	74 ng/µL
166	2011	DD	Cérebro+pulmão	416,1 ng/µL
167	2011	DD	Cérebro+pulmão	125 ng/µL

Tabela 4 (continuação)- Listagem de amostras utilizadas neste trabalho (ano, espécie e materiais utilizados) e quantificação de ARN total e dos volumes necessários para uma reacção de 50 ng.

13	2007	SC	Pulmão	123,2 ng/μL
15	2007	SC	Pulmão	58,7 ng/μL
21	2007	SC	Pulmão	82,8 ng/μL
35	2008	GM	Pulmão	43,5 ng/μL
19	2009	GM	Pulmão	101,7 ng/μL
47	2009	GM	Pulmão	40 ng/μL
42	2008	GM	Pulmão	25,8 ng/μL
26	2007	SC	Pulmão	312,4 ng/μL
94	2004	SC	Cérebro+pulmão	56,9 ng/μL
4	2006	SC	Cérebro	59,1 ng/μL
257	2011	SC	Cérebro+pulmão	37,2 ng/μL
175	2011	DD	Cérebro+pulmão	84,3 ng/μL
176	2011	DD	Cérebro+pulmão	180,1 ng/μL
183	2011	DD	Pulmão	285,1 ng/μL
186	2011	DD	Pulmão	152,1 ng/μL
198	2011	DD	Cérebro+pulmão	156 ng/μL
199	2011	DD	Cérebro+pulmão	184,6 ng/μL
250	2011	DD	Cérebro+pulmão	273,1 ng/μL
253	2011	DD	Cérebro+pulmão	132,7 ng/μL
255	2011	DD	Cérebro+pulmão	140,9 ng/μL
256	2011	DD	Pulmão	340,9 ng/μL
258	2011	DD	Cérebro+pulmão	80,4 ng/μL

Para cada reacção de amplificação foram utilizados 50ng de RNA (tabela 4). A detecção de ácido nucleico viral foi efectuada por transcrição reversa seguida de amplificação (*one step RT-PCR*). A *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) é uma reacção em cadeia realizada por uma DNA polimerase termorresistente (Taq polimerase), cujo objectivo final consiste na amplificação exponencial de uma região específica DNA, definida por dois oligonucleótidos sintéticos que tem antes de sofrer um passo de síntese de uma cadeia de ADN a partir do ARN, utilizando-se como molde uma cadeia de ARN, numa reacção catalisada por uma transcriptase reversa.

A PCR é composta por 3 fases distintas, denominadas desnaturação, *annealing* e extensão, que se repetem por 25-40 ciclos. A primeira fase de desnaturação consiste na separação da

cadeia dupla de ADN em duas cadeias simples, pela acção de altas temperaturas. Durante a fase de *annealing* ocorre a ligação dos oligonucleótidos ou *primers* às regiões específicas do ADN da amostra ou *template*, definindo a região genómica a amplificar. A temperatura à qual a ligação se processa depende da composição nucleotídica dos *primers* e da sua especificidade em relação à região de ADN a amplificar, devendo ser estabelecida para cada par de *primers*. A terceira e última fase, denominada extensão, consiste na síntese de novas cadeias de ADN a partir de cada *primer*.

Os *primers* específicos foram escolhidos pelo programa de software Primer 3, disponível através do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, com base na sequência nucleotídica do gene M do DMV, disponível através do seu número de acesso NC_005283.1, no Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_005283.1) (Tabela 5).

Tabela 5 - *Primers* utilizados no rt PCR, sua localização e dimensão, com base no sequência do gene M (DMV NC_005283.1)

Primers	Sequência (5'→3')	Localização genómica	Dimensão do fragmento
CeMV-M F	GGCTCACTCCCGCTCGGAGT	3651-3670	550 pb
CeMV-M R	TGGTCCCTCCGATTCCGCCA	4200-4181	

As reacções de amplificação foram efectuadas no volume final de 25 µl, com 12,5 µL de Fidelity Taq RTPCR Master mix 2x, 10µM de primer forward e reverse e 50ng de ARN de cada amostra. As condições de amplificação incluíram 42°C durante 30 minutos para a transcrição reversa, um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 10min, 40 ciclos a 94°C/30seg, 57-60°C/30 seg e 68°C/ 30 seg, seguidos por um passo final de extensão de 10 minutos a 68°C.

Os produtos de PCR's foram corridos em gel de agarose a 2% na presença de 2,5% de gel RED e observados no Imagemaster (Pharmacia). Para recuperar as bandas amplificadas a partir de gel utilizou-se o kit da Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymoresearch) de acordo com as instruções do fabricante.

A banda de agarose que continha o fragmento de ADN de dimensão esperada foi cortada e eluída no tampão de eluição fornecido, a 55°C até completa dissolução. O volume total foi

posteriormente aplicado numa coluna de purificação e o DNA foi fixo à matrix da coluna após centrifugação (16 000xg/1mn). Após duas lavagens com o tampão de lavagem o DNA foi eluido em 10µl de tampão de eluição.

2.4 Processamento de amostras e detecção de anticorpos

Para a detecção de anticorpos anti-CeMV utilizou-se um kit ELISA indirecta para detecção de anticorpos anti esgana de cão (Ingezim), devido à identificação de reacções antigénicas cruzadas entre os morbilivírus que afectam os cetáceos (CeMV), os cães (CDV) e os pinípedes (PDV) (Saliki, 2002). Utilizaram-se dois kits com validade até 3 e 8 de 2012 e nº de lote 141210 e 240511.

A ELISA indirecta (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos em soro ou outros materiais, como macerados de órgãos. As placas são revestidas com o antígeno e os materiais são testados para a presença de anticorpos específicos. A ligação antígeno-anticorpo é depois detectada através da utilização de um anticorpo secundário marcado com uma enzima.

A revelação dos complexos Ag /Ac primário /Ac secundário é efectuada por adição do substrato enzimático e do cromogénio. A reacção colorimétrica é posteriormente medida num espectrofotómetro.

Para a realização da ELISA utilizaram-se macerados feitos a partir de fragmentos de pulmão com cerca de 5 mm de diâmetro em 1 ml de PBS. Estas amostras foram utilizadas em natureza, a 1:2 e a 1:4. O controlo positivo e negativo, o tampão de diluição das amostras, o substrato enzimático e a solução stop foram os fornecidos pelo kit comercial.

O anticorpo secundário conjugado foi substituído pela proteína-A peroxidase (Prot.A-PO, SIGMA®), diluída em PBS com 4% de soro de cavalo em diferentes diluições de trabalho, de forma a aferir a melhor concentração. Esta proteína é um componente da parede celular do *Staphylococcus aureus* que tem a capacidade de se ligar à fracção Fc das imunoglobulinas da maior parte dos mamíferos. Esta proteína foi utilizada por outros autores para realizar ELISAs em mamíferos marinhos, nomeadamente Van Bresse e colaboradores em 2001.

A adaptação deste sistema para detecção de Ac específicos anti DMV, foi efectuada numa sequência de diferentes ensaios. O protocolo utilizado incluiu: a) a incubação do material

suspeito com o Ag dos poços da ELISA, por um período de tempo que variou entre 10 mn e 30 mn; b) a detecção dos complexos Ag/Ac utilizando o sistema Ac secundário-PO e a ProtA-PO, no qual se testaram diferentes concentrações de ProtA-PO e diferentes tempos de incubação (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/2750, 1/3000); (10, 30 e 60 minutos); c) a detecção do complexo secundário e paragem da reacção enzimática. Entre cada passo a placa foi lavada por 4 vezes no tampão de lavagem, num lavador de placas de ELISA (Thermo electron corporation Wellwash 4 MK2) e a leitura das densidades ópticas foi efectuada a 450 nm num espectrofotómetro (TECAN, Sunrise remote A-5002). As incubações foram feitas em estufa a uma temperatura de 22°C (BINDER Modelo KB 115).

Este kit considera o controlo positivo válido quando o valor de O.D. do mesmo é superior a 1 nm e valida o negativo se este tiver um valor de O.D. inferior a 0,2 nm. O valor de cut off (valor de O.D. das amostras considerados positivos) é o valor de O.D. do controlo positivo de um dado ensaio multiplicado por 0,2. Foram testadas ao todo 37 amostras.

2.5 Anatomo-histopatologia e Imunohistoquímica

Para amostras disponíveis dos animais positivos a antígeno foram feitos cortes histológicos de amostras de pulmão e cerebelo que foram coradas com hematoxilina-eosina para serem observadas num microscópio óptico com ampliação de 100 e 400x.

Estas amostras fixas em formol a 10% sofreram processos de desidratação e de diafanização seguidos de inclusão em parafina. A desidratação consistiu em passagens sucessivas em álcool a 70°, a 80°, a 90° e em álcool absoluto. A diafanização foi feita em xilol uma vez que o álcool e a parafina são imiscíveis.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com 5 µm de espessura e os cortes foram estendidos em lâminas que foram colocadas em estufa a 37°C. Para a coloração utilizou-se um corante nuclear basófilo (hematoxilina) e um corante citoplasmático acidófilo (eosina). Sendo estes corantes em solução aquosa que não se mistura com a parafina os cortes sofreram primeiro um processo de desparafinização através de passagens sucessivas em xilol, álcool em concentrações decrescentes (de absoluto até álcool a 70°) e água destilada. Depois de feita a coloração os cortes foram novamente desidratados para se poder montar a lâmina com *entellan*, que é uma resina sintética hidrófoba.

Para as lâminas de imunohistoquímica o procedimento utilizado desenvolveu-se em fragmentos de tecido fixo em formol a 10% que foi incluído em parafina e de seguida cortado num micrótoomo com 3 µm de espessura montado em lâminas *superfrost* (Thermo Scientific®).

As lâminas foram colocadas em estufa a 57° C durante 30 minutos e de seguida foi feita a desparafinização através de duas passagens sucessivas das lâminas em xilol durante 10 minutos e 5 minutos, seguida por lavagens de 2 minutos em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95% e 75%).

Após uma lavagem de 5 minutos em água destilada foi feito o bloqueio da peroxidase endógena (uma vez que esta reage com a DAB utilizada como cromogénio) com uma solução de peróxido de hidrogénio na concentração final de 0,3% em água destilada, durante 15 minutos com agitação à temperatura ambiente. A última lavagem foi realizada em TBS (*Tris-buffered saline*), durante 5 minutos.

A recuperação antigénica que consiste na exposição dos epitopos para que possa haver ligação antígeno-anticorpo, foi efectuada pelo calor utilizando para isso uma solução de citrato pH 6 na qual se submergiram as lâminas que foram então aquecidas 3 vezes sucessivas em microondas (700W), 5 minutos de cada vez. Após arrefecimento à temperatura ambiente durante 20-30 minutos as lâminas foram lavadas com agitação em 0,3% Triton X100 em PBS. O bloqueio das lâminas foi efectuada com o soro bloqueador do kit comercial de Imunohistoquímica (Zymed) durante uma hora à temperatura ambiente, seguida pela incubação com o anticorpo primário um soro positivo a AcaCDV de canídeo durante 16h a 4°C. Soros anti-CDV foram utilizados anteriormente por outros autores para realizar imunohistoquímicas em cetáceos para marcação de CeMV, nomeadamente soros monoclonais (Raga, et al., 2008 e (Di Guardo, et al. 2007). As lâminas utilizadas para controle negativo, foram incubadas com PBS nas mesmas condições.

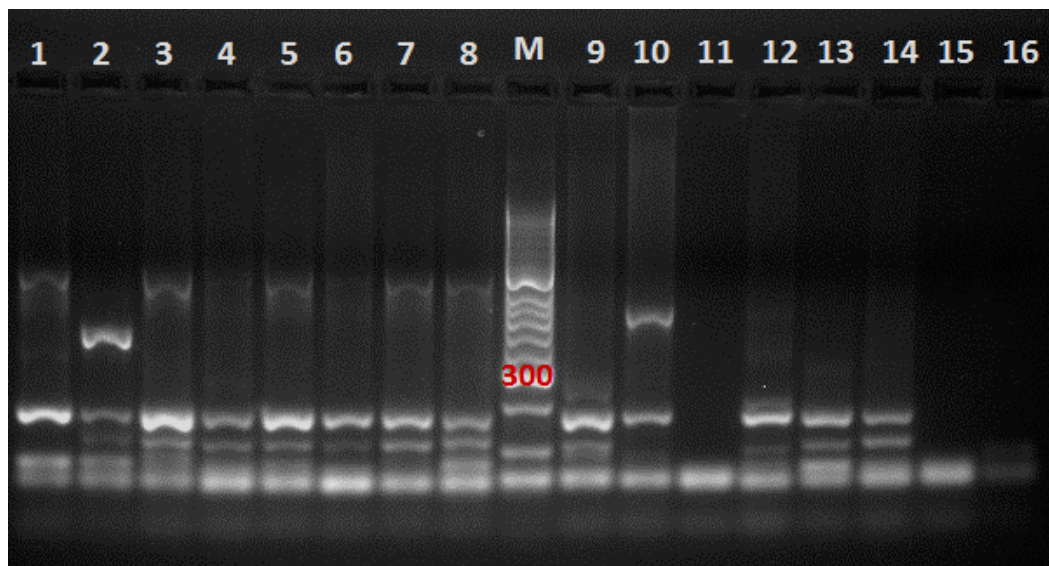
Após quatro lavagens sucessivas de 10 min cada, em PBS as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com Peroxidase (Ingenaza) durante 1 hora à temperatura ambiente, seguida de duas lavagens adicionais de 10 min em PBS. O cromogénio (diaminobenzidina (Sigma®)) foi adicionado e deixou-se actuar durante 5 minutos, no final dos quais as lâminas foram novamente lavadas com água destilada e com água corrente e desidratadas através de lavagens sucessivas em álcool 95%, álcool a 100% e xilol. A montagem foi realizada com Entellan e observadas num microscópio óptico com ampliação de 400x.

3 Resultados

3.1. RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*)

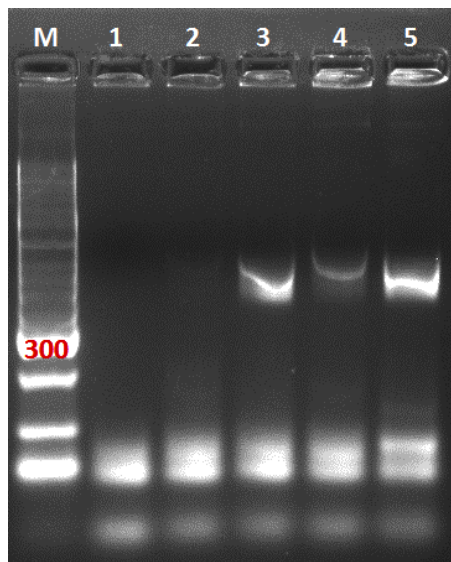
A detecção molecular de CeMV nas amostras processadas resultou na amplificação de uma banda do peso molecular esperado nas amostras 42GM2008, 257SC2011 de pulmão e 15SC2007 de pulmão e cérebro (Imagem 16).

Imagem 19 - Gel de agarose a 2% com 2,5% de gel RED: 1 – DD/137/2011; 2 – DD/141/2011; 3 – DD/156/2011; 4 – SC/159/2011; 5 – DD/160/2011; 6 – DD/162/2011; 7 – DD/166/2011; 8 – DD/167/2011; 9 – SC/13/2007; 10 – SC/15/2007; 11 – SC/21/2007; 12 – GM/35/2008; 13 – GM/19/2009; 14 – GM/47/2009; 15 e 16 – controlos negativos; M - marcador.



De forma a confirmar a especificidade dos fragmentos amplificados as bandas foram cortadas, eluídas e purificadas para serem reamplificadas em condições mais estridentes, utilizando 60°C na temperatura de annealing (Imagem 17).

Imagem 20 - Gel de agarose correspondente à amplificação das bandas obtidas anteriormente : 1 e 2 – controlo negativo; 3 – GM/42/2008; 4 – DD/186/2011; 5 – SC/257/2011; M – marcador.



Após amplificação as bandas foram sequenciadas directamente (STABvida, Portugal) e a especificidade confirmada na base de dados da NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), resultando numa identidade de 99% com as 4 sequências disponíveis para o gene M do DMV em três amostras, posteriormente confirmada no alinhamento múltiplo das sequências (Programa Pileup e Pretty, GCG Winconsin) (Imagem 18).

Considerando que a amostragem era de 40 animais, 7,5% dos animais foram positivos a ácido nucleico de CeMV.

Dos animais positivos a ácido nucleico, dois são golfinhos riscados (*Stenella coeruleoalba*) e um é uma baleia piloto (*Globicephala melas*). A baleia piloto positiva era uma fêmea madura que apresentava sinais de gestação recente, arrojada em 2008. Um dos golfinhos riscados era um macho imaturo (arrojado em 2011) e o outro animal (2007) era uma fêmea madura que estava gestante.

No caso dos golfinhos riscados, um dos animais positivos foi considerado uma captura accidental em redes de emalhar enquanto o outro foi um arrojamento vivo de um animal emaciado e com sinais de doença severa. No caso da baleia-piloto, a causa de morte não foi determinada apesar de esta apresentar sinais de interacção humana pela observação de marcas de cabos multifilamentosos no pedúnculo (base da barbatana caudal).

3.3 Elisa

A detecção de Ac específicos anti DMV foi realizada através de uma ELISA comercial, para detecção de Ac de cão antiCDV.

Os ensaios iniciais foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, utilizando os controlos fornecidos. Para aferir a utilização da PaPO como substituto do Ac secundário conjugado foram testadas diferentes diluições (1:500 a 1:3000) e diferentes tempos de incubação, tendo sido escolhida a diluição de trabalho de 1/2750 e 10 mn de incubação, devido à ausência de reacções inespecíficas com macerados de pulmão de lobo positivo a CDV por PCR e um macerado de pulmão de suíno.

Os resultados obtidos foram precedidos de uma série de ensaios que permitiram concluir:

- que a proteína A-PO a 1/2750 detectava especificamente o C+ do kit;
- que a proteína A-PO neste kit detecta anticorpos em macerados de órgãos (órgão de lobo e cão positivos);
- que não há fundo derivado do facto de estarmos a trabalhar com macerados de órgãos (órgão de suíno).

Confirmados estes pressupostos, processaram-se as amostras de cetáceos a uma diluição de $\frac{1}{2}$, e identificaram-se 2 *Stenella coeruleoalba* (golfinhos riscados) seropositivos (SC/257/11, SC/13/07), 1 *Globicephala melas* (Baleia piloto) (GM/19/09) e 2 *Delphinus delphis* (golfinhos comuns) (DD/125/2011, DD/134/2011). (Anexo 3)

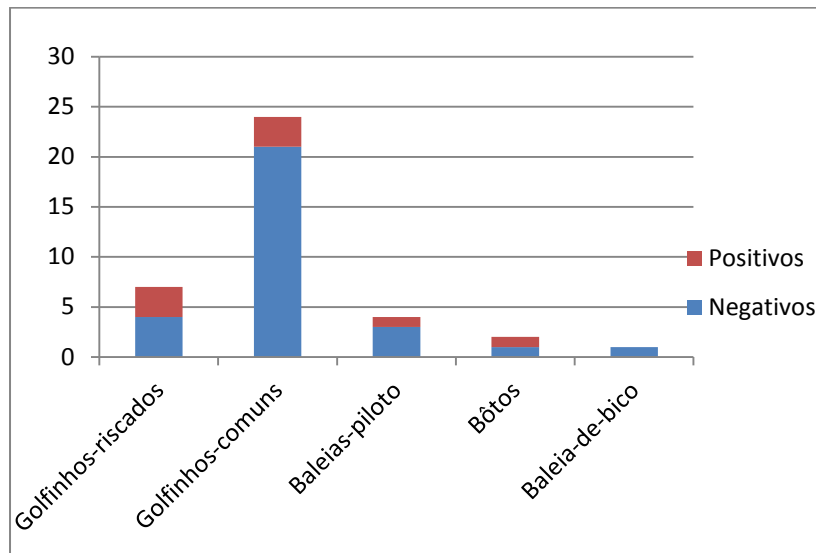
As amostras consideradas positivas a uma diluição de $\frac{1}{2}$ foram de novo testadas, desta vez com três diluições diferentes (N, $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$). Decidiu-se também repetir em duas diluições (N e $\frac{1}{2}$) as amostras cuja DO era superior a metade da diferença entre o valor de controlo de órgão negativo e o cut off, por se considerarem elevados. Este ensaio confirmou os resultados anteriores e identificou mais três amostras seropositivas (SC/159/2011; DD/162/2011; PP/253/2011). (Anexo 3).

No conjunto dos ensaios de ELISA efectuados 3/7 golfinhos-riscados (SC/13/2007; SC/159/2011; SC/257/2011) (43%) apresentavam anticorpos detectáveis; 3/24 golfinhos-comuns (DD/125/2011; DD/134/2011; DD/162/2011) (13%) foram positivos a Ac; 1/4 amostras de baleias-piloto (GM/19/2009) (25%) foi positiva e nos bôtos 1/2 amostras

disponíveis (PP/253/2011), uma foi positiva. A única baleia-de-bico analisada revelou-se negativa (imagem 19).

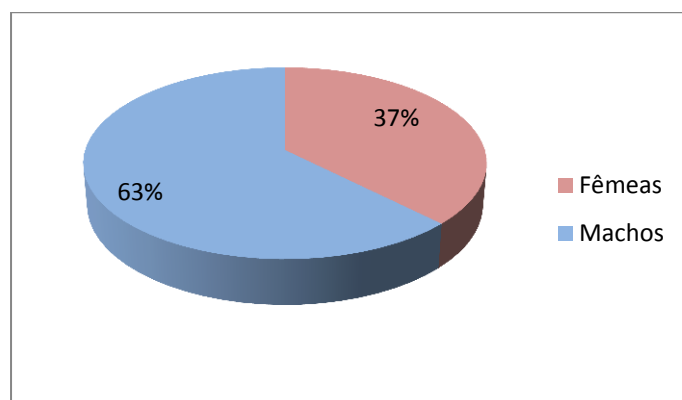
Tendo em conta que testámos 37 animais a percentagem de seropositivos é de 21,6%.

Imagem 22 - Resultados dos ensaios de ELISA realizados às amostras agrupados por espécie.



Dos animais que tiveram um valor de densidade óptica superior ao valor de cut off 3 eram do sexo feminino e 5 eram do sexo masculino (imagem 20). Dos 8 animais todos foram considerados sexualmente imaturos.

Imagem 23 - Percentagem de machos e fêmeas com Ac detectáveis pelo kit anti-CDV utilizado no ensaio ELISA realizado.

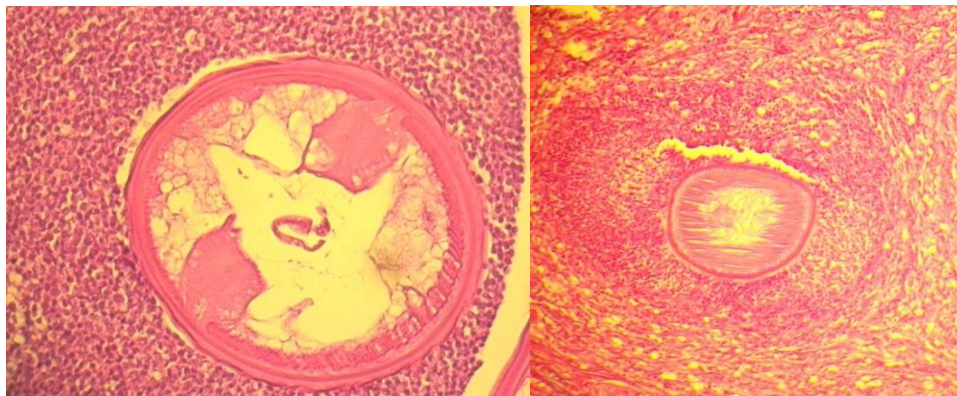


3.4 Anatomo-histopatologia e imunohistoquímica

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina foram observadas num microscópio óptico com ampliação de 100 e 400x. Não se observaram lesões típicas de infecções por morbilivírus, não tendo sido detectadas células sinciciais ou inclusões intracitoplasmáticas ou intranucleares em nenhuma das lâminas (pulmão e cérebro). Na necrópsia, um dos animais (SC/257/2011) apresentava um nível de parasitismo intenso nos pulmões – numa escala de observação com quatro níveis, este animal estava no nível 4 o mais alto-, os linfonodos apresentavam edema e o baço era de pequenas dimensões sem presença de baços acessórios. Nos brônquios observou-se a presença de nemátodes e de edema. Os pulmões apresentavam edema e congestão. Na observação microscópica observou-se edema, congestão e granulomas parasitários. Frequentemente observaram-se parasitas em corte transversal (imagem 21). Este animal apresentava também parasitas no fígado, na cavidade abdominal, no pâncreas e no primeiro estômago.

No outro animal (GM/42/2008), também não se observaram células sinciciais nem inclusões intracelulares, apesar das alterações pós-morte presentes. Este animal apresentava sinais de interacção humana com marcas de cabos multifilamentosos. Não se observaram outras alterações dignas de registo. Existiam fortes indícios de gestação recente porque se observou leite nas glândulas mamárias. A necrópsia não foi conclusiva devido aos sinais de decomposição moderada.

Imagem 24 - Imagens de microscópio óptico com ampliação de 100x e de 400x de cortes histológicos de pulmão do animal SC/257/2011 com granulomas parasitários.



As lâminas montadas para imunohistoquímica continham um corte de pulmão de cetáceo positivo por PCR a morbilivírus (SC/257/2011 e GM/42/2008), um corte de pulmão de um cão positivo a esgana e um corte de um cão negativo. As lâminas com cérebro foram emparelhadas da mesma forma e fizeram-se duas lâminas de cada um em paralelo: um conjunto (uma com cérebro e uma com pulmão) foi incubado com PBS, enquanto controle negativo da reacção e o outro conjunto foi incubado com soro de cão positivo a Ac antiCDV, disponível no Laboratório de Virologia FMV/UTL. A revelação foi efectuada com o conjugado do kit de ELISA.

As imunohistoquímicas realizadas não foram conclusivas uma vez que não houve validação do controlo negativo (PBS). O controlo negativo correspondente a uma lâmina com cortes de cérebro e outra com cortes de pulmão apresentaram o mesmo tipo de marcação inespecífica observada nas lâminas incubadas com o soro primário.

4 Discussão e conclusões

Os dados referentes a epidemias por morbilivírus em mamíferos marinhos, em diversas partes do mundo incluem as costas espanhola, francesa e turca do Mediterrâneo, entre outras, até à costa atlântica de Espanha e França incluindo ainda o Mar do Norte e o Mar Báltico.

Na zona Oeste do Atlântico há informações acerca de epidemias na costa dos EUA, na região da Flórida e Nova Jérсия. Os surtos de morbilivírus no Mediterrâneo na década de 90 abriram as portas a um estudo intensivo deste vírus nessa zona. Noutras zonas, como nos mares de Norte e Báltico o estudo abrange não só cetáceos (maioritariamente botos) mas também pinípedes.

Considerando a informação disponível sobre morbilivírus que afectam os mamíferos marinhos em Portugal, não existem dados neste matéria do meu conhecimento, este trabalho constitui a primeira abordagem a este assunto relativamente a animais arrojados na nossa costa.

Os mamíferos marinhos são provavelmente das espécies que funcionam melhor como sentinelas dos ambientes marinhos e costeiros porque são espécies com esperança média de vida elevada, são animais de topo da cadeia alimentar e têm reservas de gordura extensas que funcionam como local de armazenamento de toxinas antropogénicas (Reddy, Dierauf, & Gulland, 2001 e Wells, et al., 2004). As ameaças aos mamíferos marinhos estão na sua raiz última relacionadas geralmente com as populações humanas, com as suas taxas de crescimento, padrões de consumo e comportamentos (Marine Mammal Commission., 2004). Os morbilivírus tiveram um grande impacto na saúde e no estado de conservação de várias espécies de mamíferos aquáticos de populações de todo o mundo (Kennedy, 1998; Di Guardo, Marruchella, Agrimi, & Kennedy, 2005; Di Guardo, 2008 e van Bresse, et al., 2009), sendo por isso fundamental monitorizar a sua presença em pinípedes e cetáceos arrojados.

O rastreio molecular realizado por RT-PCR permitiu a identificação de três animais positivos a ácido nucleico de DMV. A região alvo está incluída no gene M e as bandas amplificadas, após confirmação da sua especificidade por sequenciação, apresentaram 99% de homologia com as duas sequências disponíveis para o gene M do DMV.

Dois destes animais eram golfinhos-riscados (*Stenella coeruleoalba*), um de 2007 e outro de 2011. O outro animal era uma baleia-piloto (*Globicephala melas*) do ano 2008. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o morbilivírus dos cetáceos circula nas

populações de cetáceos do Atlântico-este que arrojam na nossa costa. Esta conclusão é retirada do facto, não só, da detecção de animais positivos a ácidos nucleicos, mas também pela identificação de animais positivos a anticorpos nas ELISAs realizadas.

O CDV tem sido usado frequentemente em rastreios serológicos para estimar a prevalência da infecção por morbilivírus em pinípedes (Duignan, et al, 1994, 1995a, 1997 e Barrett, Blixenkrone-Moller, Di Guardo, Dorrington, & Duignan, 1995) e cetáceos (Barrett, Blixenkrone-Moller, Di Guardo, Dorrington, & Duignan, 1995; Di Guardo, Agrimi, Morelli, Cardeti, Terracciano, & Kennedy, 1995 e Di Guardo, Proietto, Di Francesco, Marsilio, Zaccaroni, & Scaravelli, 2010), no entanto a impossibilidade de utilizar uma ELISA específica para CeMV constituiu uma limitação à detecção de animais seropositivos. A adaptação de uma ELISA para detecção de Ac de cão antiCDV para identificação de animais seropositivos a CeMV, não nos garante uma elevada sensibilidade uma vez que se baseia em reacções cruzadas entre morbilivírus (Saliki & Lehenbauer, 2001), no entanto:

- i) a ausência de *background* no macerado de órgão de suíno que confirma a ausência de ligações inespecíficas dos restantes reagentes;
- ii) a validação da proteína A para detecção de anticorpos anti-CDV em lobo e cão em macerados de órgãos, confirmando assim a ligação específica da Proteína A à fracção Fc dos anticorpos anti-morbilivírus e a utilidade e a capacidade do kit de detectar Ac em macerados de órgãos;

permite-nos considerar que os animais com valores de D.O. superiores ao valor de cut off são realmente seropositivos a morbilivírus de cetáceos.

Neste estudo obtivemos animais que eram positivos a antigénio e positivos a anticorpos (n=2), um animal que foi positivo a antigénio e negativo a anticorpos e outros que foram negativos a antigénio viral mas que foram positivos a anticorpos (n=6).

A identificação de animais antigénio negativos, mas seropositivos pode indicar contacto prévio com o vírus com desenvolvimento de anticorpos que persistiram, possibilitando assim a sua detecção. A não detecção de antigénio nestes animais pode indicar três possibilidades distintas:

- 1) ausência de infecção viral, no momento do teste;
- 2) impossibilidade de detecção do RNA viral por deterioração do mesmo ou falta de sensibilidade da técnica.
- 3) cura espontânea após infecção subclínica.

O caso dos animais que eram positivos a antígeno e negativos a anticorpos, pode identificar animais infectados mas que não seroconverteram, tais como animais imunodeprimidos ou com infecção muito recente. Pode ainda dever-se à não detecção de anticorpos, que poderiam estar presentes, pela prova de ELISA realizada.

Para o esclarecimento destas situações seria necessário utilizar uma ELISA específica ou a prova de seroneutralização, que nos permite a detecção e a quantificação de anticorpos anti-DMV nestes animais, embora no caso da seroneutralização só os Ac neutralizantes seriam detectados se presentes.

Resultados de um estudo serológico em golfinhos-riscados (*Stenella coeruleoalba*) do golfo de Valência e águas adjacentes indicou que apenas golfinhos adultos tinham anticorpos anti-DMV e que a seroprevalência nesta faixa etária decresceu de 100 para 50% desde o surto de 1990-92 até à data do estudo em 2001 (van Bressem, et al., 2001).

No trabalho aqui apresentado, todos os animais seropositivos foram considerados sexualmente imaturos (juvenis), com base na observação das gónadas e em muitos casos pelo comprimento corporal uma vez que este se correlaciona com a maturidade sexual (Calzada, 1995). Este dado foi utilizado diversas vezes para determinações aproximadas da idade (van Bressem et al 2001 e Raga, et al., 2008). Tendo em conta que a nossa amostragem foi constituída maioritariamente por animais imaturos (32/40 animais), seria necessária uma maior amostragem para poder atribuir alguma significância a esse facto.

É de referir que os dois golfinhos-riscados apresentados neste estudo positivos a antígeno um era sexualmente maturo (fêmea gestante) e outro era um macho sexualmente imaturo.

O estudo por van Bressem e colaboradores de 2001 referido anteriormente apontou para uma possível perda de imunidade humoral na população de riscados do Mediterrâneo que sugeria que o vírus não seria endémico nesta população, encontrando-se esta população em risco de nova epidemia. Esta teoria era também corroborada por dados populacionais que mostravam que a densidade de golfinhos riscados (*Stenella coeruleoalba*) no golfo de Valência em 2001-2003 estaria próxima do máximo reportado para esta espécie no Oeste do Mediterrâneo (Gómez de Segura, Crespo, Pedraza, Hammond, & Raga, 2006) uma vez que a densidade

populacional elevada propicia a propagação da infecção por morbilivírus (Black, 1991). De facto, um aumento de mortalidade em riscados foi detectada no Golfo de Valência no início de Julho de 2007 associada ao morbilivírus dos cetáceos. Neste episódio, maior parte dos arrojamentos foram de animais mortos, encontrados em vários estadios de decomposição. Alguns dos animais arrojados foram encontrados ainda vivos e todos apresentavam sintomatologia neurológica, morrendo após o resgate (Raga, et al., 2008). Neste ano, as mortalidades foram observadas em animais mais jovens do que na epidemia de 1990-92 e aparentemente com infecções mais severas.

O facto de o RNA viral se degradar com relativa facilidade pode ser um entrave à detecção de antígeno por PCR, pelo que a existência de outros animais positivos não pode ser descartada. A percentagem de seropositivos pode também ser mais elevada tendo em conta que o teste utilizado não é específico e será também menos sensível. A possibilidade de os animais seropositivos resultarem de ligações inespecíficas dos anticorpos ou da proteína A existe mas tendo em conta os pressupostos já mencionados não parece ser esse o caso.

A análise histológica realizada a estes animais não revelou a presença de células sinciciais ou de inclusões intracelulares observadas tipicamente nos morbilivírus, mas em alguns animais infectados estas lesões não são encontradas – num estudo por Domingo et al em 1992 realizado com golfinhos riscados 65% apresentava células sinciciais nos pulmões e apenas 22% apresentava células sinciciais no sistema nervoso central. No mesmo estudo, dos animais infectados estudados 72% apresentava pneumonia bronco-intersticial e 69% encefalite não supurativa.

A observação microscópica não revelou pneumonia bronco-intersticial nem encefalite. Num animal positivo a antígeno viral observaram-se lesões no pulmão compatíveis com uma pneumonia de origem parasitária, o que corrobora as observações de necropsia onde foi detectado um nível de parasitismo intenso no aparelho respiratório. Este quadro é frequentemente observado em animais infectados com Morbilivirus devido às características imunossupressoras da infecção (Kennedy, Smyth, Cush, McAliskey, McCullough, & Rima, 1991).

As imunohistoquímicas realizadas não foram conclusivas pois não se validou o controlo negativo. Seria importante repetir o ensaio para confirmar a presença do antígeno viral nos pulmões e no cérebro uma vez que estes são os órgãos onde é mais frequentemente encontrado – em 77% dos animais estudados por Domingo et al em 1992 detectaram antígeno viral nos pulmões e em 70% no cérebro.

O facto de os dados aqui utilizados resultarem de arrojamentos impede que estes sejam transpostos directamente para as populações e que sejam correlacionados com taxas de mortalidade (Gulland & Hall, 2007). No entanto, esta informação é a única disponível para avaliar a infecção por morbilivírus em animais de vida livre.

A manutenção de registos actualizados que contenham todas as informações recolhidas e processadas destes animais vai possibilitar no futuro a análise comparativa destes dados, podendo acrescentar valor às informações obtidas, à semelhança do que ocorreu no golfo de Valência e em outras zonas do Mediterrâneo (Raga, et al., 2008 e Di Guardo, 2008).

É de referir que um dos animais positivos a antigénio é um animal da espécie *Globicephala melas* (baleia piloto) que tem sido apontada como um possível reservatório do vírus. Este animal apresentava indícios de interacção humana e não apresentava sinais de doença, apesar de se encontrar num estado de decomposição moderada o que dificultou as observações. Em estudos anteriores, a prevalência de baleias-piloto arrojadas seropositivas era de 93% (Barrett, Blixenkrone-Moller, Di Guardo, Dorrington, & Duignan, 1995).

Neste trabalho, apenas 1 baleia piloto foi seropositiva em 4 amostras, mas, mais uma vez, temos de ter em conta a especificidade e sensibilidade do teste utilizado.

Em 2007, quando ocorreu o surto de morbilivírus em riscado, houve também um pico de mortalidade em baleias-piloto que foi associado ao vírus, levantando a hipótese de transmissão interespecie uma vez que os vírus eram geneticamente semelhantes (Férrandez, A. et al 2008).

Estes dados levantam novas questões cujas respostas podem ajudar a compreender a ecologia deste vírus. O facto de Portugal ser um país que fica junto ao Mediterrâneo e que é banhado em todas as suas costas pelo oceano Atlântico faz com que seja muito importante perceber se o vírus que infecta os animais nesta área (Atlântico este) é o mesmo que causa epidemias na zona do Mediterrâneo, uma vez que estudos anteriores sugerem haver algum grau de isolamento entre as duas populações (Bourret, Mathias, & Crouau-Roy, 2007 e García-Martínez, Moya, Raga, & Latorre, 1999).

Em 2008, Raga e colaboradores salientaram o facto de as epidemias de 1990-92 e 2007 terem tido início no oeste do Mediterrâneo, próximo do Estreito de Gibraltar, onde o contacto com animais infectados do Atlântico pode ter ocorrido. Assim, a pergunta que se impõe neste momento é qual a fonte de infecção para estas populações e qual a ligação entre os surtos de morbilivírus no Mediterrâneo e estes animais positivos a morbilivírus no Atlântico este,

salientando que um dos golfinhos riscados positivo a morbilivírus arrojou em Maio de 2007, antes do pico de mortalidade que se detectou em Valência em Julho.

Além dos efeitos devastadores das epidemias de morbilivírus, responsáveis pela morte de milhares de cetáceos entre 1990-1992, um novo estudo vem alertar para as consequências que se seguem a surtos de morbilivírus.

Depois da primeira epidemia foram encontrados animais com infecções por morbilivírus que estavam limitadas ao sistema nervoso central, com sinais semelhantes aos de panencefalite esclerosante subaguda ou de encefalite do cão velho, à semelhança do que ocorre com o MV e o CDV, e o mesmo ocorreu após a epidemia de 2007 (Soto, et al., 2011). Esse estudo refere ainda que a infecção por DMV no sistema nervoso é a principal causa de morte e arrojamento de golfinhos riscados no Mediterrâneo nos anos que se seguiram aos surtos, podendo os seus efeitos nefastos sobrepor-se até aos da epidemia, de 2007 (Soto, et al., 2011).

No trabalho aqui apresentado os três animais positivos foram em amostras de pulmão em dois casos e de pulmão e cérebro noutra caso. Esta informação exclui estes animais da situação apresentada anteriormente, em que a infecção se encontra apenas no sistema nervoso.

No futuro seria interessante alargar o rastreio a mais amostras e desenvolver um real time RT-PCR, com maior sensibilidade. Seria também importante avaliar geneticamente as amostras positivas, nomeadamente a sequência nucleotídica do gene N e P e determinar se o vírus detectado nestes animais é o mesmo que circula no Mediterrâneo, porque as informações disponíveis na bibliografia (Raga, et al., 2008 e Taubenberger, et al., 2000) avaliam estas regiões genómicas virais, para aferir proximidade filogenética. O desenvolvimento de uma ELISA específica para DMV seria igualmente interessante uma vez que as informações acerca de prevalência de seropositivos ao longo do tempo podem ser cruciais para a previsão de novos surtos.

A existência de surtos de morbilivírus em golfinhos riscados no Atlântico não pode ser descartada, tendo em conta o que ocorre nesta espécie no Mediterrâneo. Os picos de mortalidade observados no Mediterrâneo (Aguilar, 1990 e Raga, et al., 2008) que resultaram na detecção das epidemias de morbilivírus não se observam com tanta intensidade na nossa costa, talvez devido às características do Atlântico e do Mediterrâneo, que provocam padrões de arrojamento diferentes.

O estudo interdisciplinar destes animais abre portas a um conhecimento mais profundo acerca dos perigos que correm e do estado de conservação destas populações. O conhecimento dos

números das populações do Atlântico é igualmente importante uma vez que estes dados se podem cruzar com dados serológicos, permitindo uma avaliação epidemiológica rigorosa.

A importância deste vírus, enquanto agente infeccioso, faz com que o seu estudo seja crucial para a tomada de decisões no que diz respeito à conservação de cetáceos, uma vez que pode pôr em causa a sobrevivência destas espécies que sofrem pressões de selecção muito elevadas.

Bibliografia

- Aguilar, A. (1990). Dolphin die-off in the Western Mediterranean. *ECS Newsletter*, 9:4.
- Aguilar, A., & Borrel, A. (1995). Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in Striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Science of the Total Environment*, 154, 237-247.
- Aguilar, A., & Raga, J. (1993). The Striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea. *Ambio*, 22, 524-528.
- Barrett, T. (1999). Morbillivirus infections with special emphasis on morbillivirus of carnivores. *Vet. Microbiol.*, 69, 3-13.
- Barrett, T., Blixenkrone-Moller M, Di Guardo G, Domingo M, Duignan P, Hall A, et al. Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Vet Microbiol.* 1995;44:261-5.
- Barrett, T., Blixenkrone-Moller, M., Di Guardo, G., Dorrington, M., & Duignan, P. (1995). Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Vet. Microbiol.*, 44, 261-165.
- Barrett, T., Pastoret, P., & Taylor, W. (2006). *Rinderpest and Peste des Petits Ruminants: virus plagues of large and small ruminants*. London: Elsevier.
- Barrett, T., Visser, I., Mamaev, L., Goatley, L., Van Bresse, M., & Osterhaus, A. (1993). Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology*, 193, 1010-1012.
- Bellièvre, E., Espéron, F., Fernández, A., Arbelo, M., Muñoz, M., & Sánchez-Vizcaíns, J. (2011). Phylogenetic analysis of a new cetacean morbillivirus from a short finned pilot whale stranded in the Canary Islands. *Res. Vet. Sci.*, 90, 324-328.
- Bengston, J., Boveng, P., Have, P., Heide-Jorgensen, M.-P., & Harkonen, T. (1991). Antibodies to canine distemper virus in antarctic seals. *Marine Mammal Science*, 7, pp. 85-87.

- Birkun, A., Kuiken, T., & Krivokhizhin, S. (1999). Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black Sea. *The Veterinary Record*, 144, 85-92.
- Black, F. (1991). Epidemiology of Paramyxoviruses. In L. Kingsburry (Ed.), *The Paramyxoviruses* (pp. 509-536). New York, NY: Plenum Press.
- Bolt, G., & Blixenkrone-Moller, M. (1994). Nucleic acid hybridization analyses confirm the presence of a hitherto unknown morbillivirus in Mediterranean dolphins. *Vet. Microbiol.*, 41, 363-72.
- Bolt, G., Alexandersen, S., & Blixenkrone-Moller, M. (1995). The phosphoprotein gene of a dolphin morbillivirus isolate exhibits genomic variation at editing site. *Journ. Gen. Virol.*, 76, 3051-3058.
- Bourret, V., Mathias, R., & Crouau-Roy, M. (2007). Genetic variation and population structure of western Mediterranean and North Atlantic *Stenella coeruleoalba* populations inferred from microsatellite data. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 87, 265-269.
- Cabral, M., Almeida, J., Almeida, P., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M., et al. (Eds.). (2006). *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal* (2ª Edição ed.). Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza/Assírio e Alvim.
- Calzada, N. (1995). *Biología del delfín listado (Stenella coeruleoalba) del Mediterraneo occidental*. Barcelona (Spain): University of Barcelona.
- Calzada, N., & Aguiar, A. (1995). Geographical variation of body size in western Mediterranean Striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Z Saeuget*, 60, 257-264.
- Carter, S., Hughes, D., Taylor, V., & Bell, S. (1992). Immune responses in common and grey seals during the seal epizootic. *Sci. Total. environ.*, 115, 83-91.
- Carwardine, M. (1995). *Whales, Dolphins and Porpoises*. London, UK: Dorling Kindersley.
- Culik, B. (2004). *Review of Small Cetaceans - Distribution, Behaviour, Migration and Threats*. Bonn, Germany: UNEP/CMS Secretariat.
- Curran, J., Marq, J., & Kolakofsky, D. (1992). The sendai virus nonstructural C proteins specifically inhibit viral mRNA synthesis. *Virology*, 189, 647-56.

- Deem, S., Spelman, L., Yates, R., & Montali, R. (2000). Canine Distemper in terrestrial carnivores: a review. *J. Zoo Wildl. Med.*, 31, 441-51.
- Di Francesco, C., Marsilio, F., Proietto, U., Mignone, W., Casalone, C., & Di Guardo, G. (2010). Anti-morbillivirus antibodies in stranded dolphins (*Stenella coeruleoalba*): time and temperature dependent fluctuations. *Aq. Mammals*, 36, 294-297.
- Di Guardo, G. (2008). Dolphin morbillivirus in the Mediterranean Sea. *Aquatic Mammals*, 34, 514-515.
- Di Guardo, G., Agrimi, U., Morelli, L., Cardeti, G., Terracciano, G., & Kennedy, S. (1995). Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 e 1993. *Veterinary Record*, 136, 439-442.
- Di Guardo, G., Cocumelli, C., Scholl, F., Di Francesco, C., Speranza, R., Pennelli, M., et al. (2010). *Chronic Morbilliviral Encephalitis in a Young Striped Dolphin from Italy*. Retrieved from Nature Precedings : <http://hdl.handle.net/10101/npre.2010.4912.1>
- Di Guardo, G., Marruchella, G., Agrimi, U., & Kennedy, S. (2005). Morbillivirus infections in aquatic mammals: A brief overview. *Journal of Veterinary Medicine*, 52, 88-93.
- Di Guardo, G., Proietto, U., Di Francesco, C., Marsilio, F., Zaccaroni, A., & Scaravelli, D. (2010). Cerebral toxoplasmosis in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the lingurian sea coast of Italy. *Veterinary Pathology*, 47, 245-253.
- Di Guardo, G., Proietto, U., Di Francesco, C., Marsilio, F., Baffoni, M., Zaccaroni, A., et al. (n.d.). *Exposure occurred, but Morbillivirus was not the likely cause of striped dolphin deaths in the Lingurian Sea during 2007*. Retrieved Setembro 10, 2011, from www.iwcoffice.org: http://www.iwcoffice.org/_documents/sci_com/SC60docs/SC-60-E10.pdf
- Domingo, M., Vilafranca, M., Visa, J., Prats, N., Trudgett, A., & Visser, I. (1995). Evidence for chronic morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Vet. Microbiol.*, 44(2-4), 229-39.
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A., Ferrer, L., Rabanal, R., et al. (1992). Pathologic and immunocytochemical studies of Morbillivirus infection in Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology*, 29:I, 1-10.

- Duignan, P., Geraci, J., Raga, J., & Calzada, N. (1992). Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia e Murcia, Spain. *Can. J. Vet. Res.*, *56*, 242-248.
- Duignan, P., House, C., Geraci, J., Duffy, N., Walsh, M., Early, G., et al. (1995b). Morbillivirus Infection in Cetaceans of the Northern Atlantic. *Vet. Microbiol.*, *44*, 241-9.
- Duignan, P., House, C., Geraci, J., Early, G., Copland, H., Walsh, M., et al. (1995). Morbillivirus infection in two species of pilot whale (*Globicephala* sp.) from the western Atlantic. *Marine Mammal Science*, *11*, 150-162.
- Duignan, P., Nielsen, O., House, C., Kovacs, K., Duffy, N., Early, G., et al. (1997). Epizootiology of morbillivirus infection in harp, hooded and ringed seals from the Canadian Arctic and Western Atlantic. *J. Wildl. Dis.*, *33*, 7-19.
- Duignan, P., Saliki, J., St. Aubin, D., Early, G., Sadove, S., House, J., et al. (1995a). Epizootiology of morbillivirus infection in North American harbor seals (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*). *Journal of Wildlife Diseases*, *31*, 491-501.
- Duignan, P., Saliki, J., St. Aubin, D., House, J., & Geraci, J. (1994). Neutralizing antibodies to phocine distemper virus in Atlantic walruses (*Odobenus rosmarus rosmarus*) from Arctic Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, *33*, 7-19.
- Fernández, A., Esperón, F., Herraéz, P., Monteros, A., Clavel, C., Bernabé, A., et al. (2008). Morbillivirus and Pilot Whales Deaths, Mediterranean Sea. *Emerg. Infect. Dis.*
- Follmann, E., Garner, G., Evermann, J., & McKeirnan, A. (1996). Serological evidence of morbillivirus infection in polar bears (*Ursus maritimus*) from Alaska and Russia. *Veterinary Record*, *138*, 615-618.
- García-Martínez, J., Moya, A., Raga, J., & Latorre, A. (1999). Genetic differentiation in the Striped Dolphin *Stenella coeruleoalba* from European waters according to mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis. *Mol. Ecol.*, *8*, 1069-1073.
- Garner, G., Evermann, J., Saliki, J., Follmann, E., & McKeirnan, A. (2000). Morbillivirus ecology in polar bears (*Ursus maritimus*). *Polar Biology*, *23*, 474-478.

- Geracy, J. L. (1993). *Marine Mammals Ashore - a field guide for strandings*. Galveston, Texas: Texas A&M Sea Grant Publications.
- Gómez de Segura, A., Crespo, E., Pedraza, S., Hammond, P., & Raga, J. (2006). Abundance of small cetaceans in the waters of the central spanish Mediterranean. *Marine Biology*, 150, 149-60.
- Goujon, M. (1996). Driftnet incidental catch and population dynamics of dolphins off the Bay of Biscay. *15*, 239.
- Grant, R. (2008). *Development of a novel molecular and serological diagnostic assays for the rapid and differential detection of marine mammal morbillivirus*. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, University of Florida, Florida.
- Graves, M., Griffin, D., Johnson, R., Hirsch, R., de Soriano, I., Roedenbeck, S., et al. (1984). Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infections. *J Virol*, 49, 409-12.
- Gulland, F., & Hall, A. (2007). Is marine mammal health deteriorating? Trends in the global reporting of marine mammal disease. *Ecohealth*, 4, 135-50.
- Haas, L., Subbarao, S., Harder, T., Liess, B., & Barrett, T. (1991). Detection of phocid distemper virus RNA in seal tissues using slot hybridization and the polymerase chain reaction amplification assay: genetic evidence that the virus is distinct from canine distemper virus. *J.Gen.Virol.*, 72, 825-32.
- Hall, W., Kovatch, R., Herman, P., & Fox, J. (1971). Pathology of measles in rhesus monkeys. *Vet. Pathol.*, 8, 307-19.
- Harder, T., Willhaus, T., Frey, H., & Liess, B. (1990). Morbillivirus infections of seals during the 1988 epidemic in the Bay of Heligoland: Transmission studies of cell culture-propagated virus in harbor seals (*Phoca vitulina*) and grey seal (*Halichoerus grypus*): clinical, virological and serological results. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 37, 641-650.
- Harkonen, T., Dietz, R., Reijnders, P., Teilmann, J., Harding, K., Hall, A., et al. (2006). A review of the 1988 and 2002 phocine distemper virus epidemics in European harbour seals. *Dis. Aquat. Organ.*, 68, 115-30.

- Heany, J., Barrett, T., & Cosby, S. (2002). Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J. Virol.*, 76, 3579-84.
- Heide-Jorgensen, M., & Harkonen, T. (1992). Epizootiology of the seal disease in the eastern North Sea. *Journal of Applied Ecology*, 29, 99-107.
- Houston, J. (1990). Status of True's Beaked Whale, *Mesoplodon mirus*, in Canada. *Can Field Nat*, 104, 135-137.
- Inskeep, W., Gardiner, C., Harris, R., Dubey, J., & Goldaton, R. (1990). Toxoplasmosis in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 26, 377-382.
- Jauniaux, T., Charlier, G., Desmecht, M., Haelters, J., Jacques, T., Losson, B., et al. (2000). Pathological findings in two fin whales (*Balenoptera physalus*) with evidence of morbillivirus infection. *J. Comp. Pathol.*, 123, 198-201.
- Jefferson, T., Leatherwood, S., & Webber, M. (1993). *FAO Species Identification Guide. Marine Mammals of the World*. Rome: UNEP/FAO.
- Keck, N., Kwiatek, O., Dhermain, F., Dupraz, F., Boulet, H., Danes, C., et al. (2010). Resurgence of morbillivirus infection in Mediterranean dolphins off the French coast. *Vet. Rec.*, 166, 654-655.
- Kennedy, S. (1998). Morbillivirus infections on aquatic mammals. *Journal of Comparative Pathology*, 119, 201-225.
- Kennedy, S., Smyth, J., Cush, P., McAliskey, M., McCullough, S., & Rima, B. (1991). Histopathologic and Immunocytochemical Studies of Distemper in Harbor Porpoises. *Veterinary Pathology*, 28:1, 1-6.
- Kennedy, S., Smyth, J., McCullough, S., Allan, G., & McQuaid, S. (1988). Viral distemper now found in porpoises. *Nature*, 336, 21.
- Kennedy-Stoskopf, S., Stoskopf, M., Eckhaus, M., & Strandberg, D. (1999). Isolation of a retrovirus and a herpesvirus from a captive California seal lion. *Journal of Wildlife Diseases*, 22, 524-528.

- King, D., Aldridge, B., Kennedy, S., & Stott, J. (2001). Immunology. In L. Dierauf, & F. Gulland (Eds.), *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine - Health, Disease and Rehabilitation*. CRC Press.
- Knipe, D., & Howley, P. (2001). *Fundamental Virology* (4th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Kobune, F., Takahashi, H., Terao, K., Ohkawa, T., Ami, Y., Suzaki, Y., et al. (1996). Nonhuman primate models of measles. *Lab. Anim. Sci.*, 46, 315-20.
- Kondratov, I., Denikina, N., Belikov, S., Durymanova, A., Ustinova, E., & Shestopalov, A. (2003). Mollusks as a natural reservoir of morbilliviruses. *Dokl. Biol. Sci.*, 389, 154-6.
- Kuiken, T., & Hartmann, M. (1991). Cetacean Pathology: Dissection Techniques and Tissue Sampling. *Proceedings of the first ECS Workshop, ECS Newsletter 17 - Special Issue*.
- Lipscomb, T., Kennedy, S., Moffett, D., Krafft, A., Klaunberg, B., Lichy, J., et al. (1996). Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, 283-290.
- Lipscomb, T., Schulman, F., Moffett, D., & Kennedy, S. (1994). Morbilliviral Disease in Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 Epizootic. *Journal of Wildlife Diseases*, 30, 567-571.
- Marine Mammal Commission. (2004). *Annual Report to Congress*. Bethesda: Marine Mammal Commission.
- McCullough, S., McNeilly, F., Allan, G., Kennedy, S., Smyth, J., Cosby, S., et al. (1991). Isolation and characterization of a porpoise morbillivirus. *Archives of Virology*, 118, 247-252.
- Osterhaus, A., Groen, J., Uytdehaag, F., Visser, I., Vedder, E., Crowther, J., et al. (1989, Setembro 16). Morbillivirus infections in European seals before 1988. *Veterinary Record*, 125, p. 326.
- Paterson, R., & Lamb, R. (1990). RNA editing by G-nucleotide inserton in mumps virus P-gene mRNA transcripts. *J. Virol.*, 64, 4137-45.
- Perrin, W., & Reilly, S. (1984). Reproductive parameters of dolphins and small whales of the family Delphinidae. *Rep. Int. Whal. Commn., Special Issue 6*, pp. 97-133.

- Perrin, W., Bernd, W., & Thewissen, J. (Eds.). (n.d.). *Encyclopedia of Marine Mammals* (2ª Edição ed.). Elsevier.
- Perrin, W., Wilson, C., & Archer, F. (1994). Striped dolphin *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833). In S. Ridgway, & S. Harrison (Eds.), *Handbook of Marine Mammals* (Vol. 5: The first book of dolphins, pp. 129-160). London: Academic Press.
- Raga, J., Banyard, A., Domingo, M., Corteyn, M., Van Bressen, M., Fernández, M., et al. (2008). Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean sea. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 471-473.
- Reddy, M., Dierauf, L., & Gulland, F. (2001). Marine mammals as sentinels of ocean health. In L. Dierauf, & F. Gulland (Eds.), *Marine Mammal Medicine* (2ª Edição ed., pp. 3-13). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Reeves, R., Smith, B., Crespo, E., & Nortobartolo di Sciara, G. (2003). *Dolphins, Whales and Porpoises: 2002-2010 Conservation Action Plan for the World's Cetaceans*. Gland, Switzerland and Cambridge: IUCN, SSC Cetacean Specialist Group.
- Reid, J., Evans, P., & Northridge, S. (2003). *Atlas of Cetacean Distribution in north-west European Waters*. Peterborough: Joint Nature Conservation Committee.
- Reidarson, T., McBain, J., House, C., King, D., Stott, J., Krafft, A., et al. (1998). Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. *J. Wildl. Dis.*, 34, 771-6.
- Reyes, J. (1991). The Conservation of Small Cetaceans: a review. *Secretariat of the Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals*. Bonn: UNEP/CMS Secretariat.
- Rice, D. (1998). Marine Mammals of the World: Systematics and distribution. (D. Wartzok, Ed.)
- Rosel, P., Tiedemann, R., & Walton, M. (1999). Genetic evidence for limited trans-Atlantic movements of the harbour porpoise *Phocoena phocoena*. *Mar Biol*, 133, 583-591.
- Rowles, T., Van Dolah, F., & Hohn, A. (2001). Gross Necropsy and Specimen Collection Protocols. In L. Dierauf, & F. Gulland (Eds.), *CR Handbook of Marine Mammal Medicine* (pp. 449-470). Boca Raton: CRC Press.

- Sakaguchi, M., Yoshikawa, Y., Yamanouchi, K., Takeda, K., & Sato, T. (1986). Characteristics of fresh isolates of wild measles virus. *Jpn. J. Exp. Med.*, 56, 61-7.
- Saliki, J., & Lehenbauer, T. (2001). Monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of morbillivirus antibody in marine mammal sera. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 1877-81.
- Saliki, J., Cooper, E., & Gustavson, J. (2002). Emerging morbillivirus infections of marine mammals: development of two diagnostic approaches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 969, 51-9.
- Santibanez, S., Niewiesk, S., Heider, A., Schneider-Schaulies, J., Berbers, G., Zimmermann, A., et al. (2005). Probing neutralizing-antibody responses against emerging measles virus (MVs): immune selection of MV by H protein-specific antibodies? *J. Gen. Virol.*, 86, 365-74.
- Sequeira, M., Inácio, A., & Reiner, F. (1992). Arrojamentos de mamíferos marinhos na Costa Continental Portuguesa entre 1978 e 1988. *Estudos de Biologia e Conservação da Natureza*, 7.
- Silvani, L., Gazo, M., & Aguilar, A. (1999). Spanish driftnet fishing and incidental catches in the western Mediterranean. *Biol. Cons.*, 90, 79-85.
- Simmonds, M. (1994). Saving Europe's Dolphins. *Oryx*, 28, 238-248.
- Sips, G., Chesik, D., Glazenburg, L., Wilschut, J., De Keyser, J., & Wilczak, N. (2007). Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. *Rev. Med. Virol.*, 17, 23-244.
- Soto, S., Alba, A., Ganges, L., Vidal, E., Raga, J., Alegre, I., et al. (2011). Post-epizootic chronic dolphin morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 96, 187-194.
- Taubenberger, J., Tsai, M., Atkin, T., Fanning, T., Krafft, A., Moeller, R., et al. (2000). Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephala melas*). *Emerg. Infect. Dis.*, 6, 42-5.
- Teixeira, A. (1979). *Algumas notas sobre os mamíferos marinhos da costa Portuguesa*. Museu do mar, Cascais.

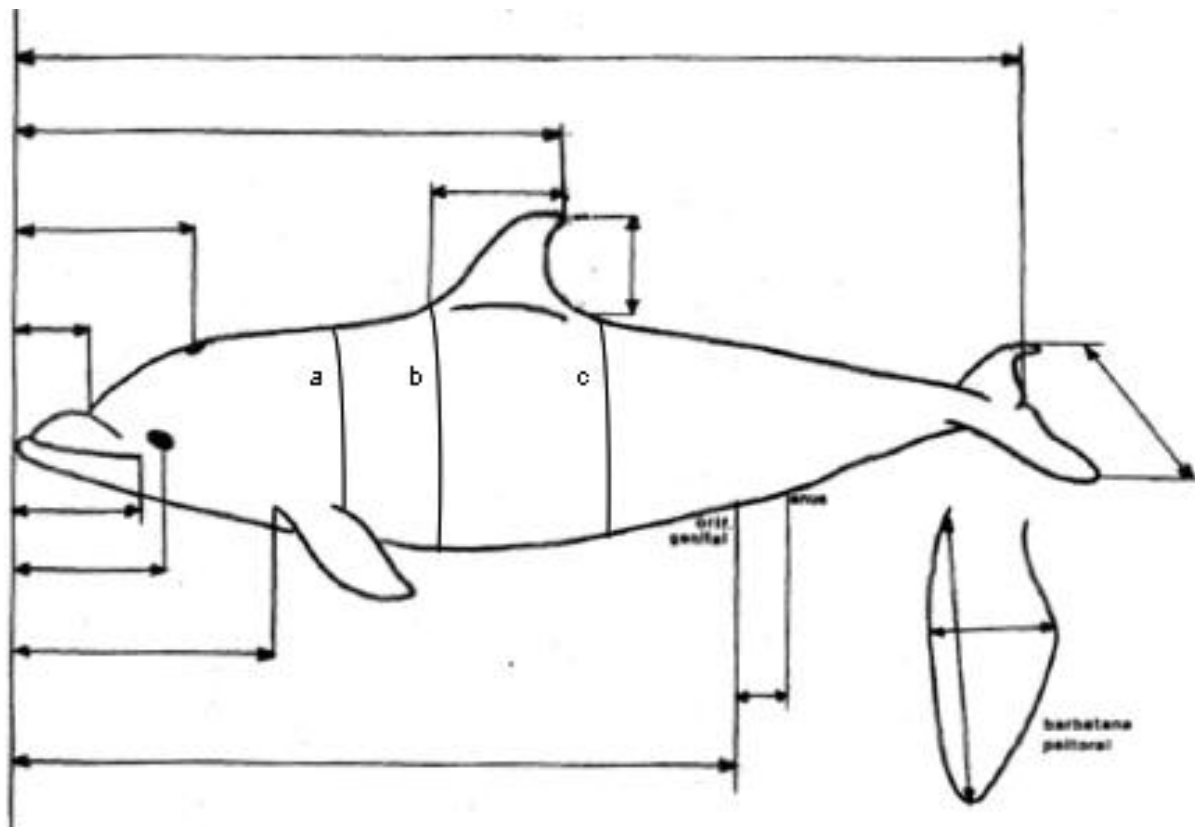
- van Bresseem, M., Raga, J., Di Guardo, G., Jepson, P., Duignan, P., Siebert, U., et al. (2009). Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86, 143-157.
- van Bresseem, M., van Waerebeek, K., & Raga, J. (1999). A review of virus infections of cetaceans and the potencial impact of morbilliviruses, poxviruses and papillomaviruses and host population dynamics. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38, 53-65.
- Van Bresseem, M., Van Waerebeek, K., Fleming, M., & Barrett, T. (1998). Serological evidence of morbillivirus infection in small cetaceans from the southeast pacific. *Veterinary Microbiology*, 59, 89-98.
- Van Bresseem, M., Visser, I., Van de Bildt, M., Teppema, J., Raga, J., & Osterhaus, A. (1991). Morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Record*, 129, 471-472.
- van Bresseem, M., Waerebeek, K., Jepson, P., Raga, J., Duignan, P., Nielsen, O., et al. (2001). An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Vet Microbiol*, 81, 287-304.
- Visser, I., Grachev, M., Orvell, C., De Vries, P., Broeders, H., Van de Bildt, M., et al. (1990). Comparison of two morbilliviruses from seals during outbreaks of distemper in northwest Europe and Siberia. *Arch. Virol.*, 111, 149-164.
- Visser, I., Van Bresseem, M., De Swart, R., Van de Bildt, M., Vos, H., Van der Heijden, R., et al. (1993). Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *Journal of General Virology*, 74, 631-641.
- von Messling, V., Milosevic, D., & Cattaneo, R. (2004). Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazes by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(39), 14216-21.
- Wells, R., Rhinehart, H., Hansen, L., Sweeney, J., Townsend, F., Stone, R., et al. (2004). Bottlenose dolphins as marine ecosystem sentinels: Developing a health monitoring system. *Ecohealth*, 1, 246-254.
- Williams, E., & Barker, I. (Eds.). (2001). *Infectious diseases of wild mammals*. (3^a Edição ed.). Iowa: Blackwell Publishing.

Yanagi, Y., Takeda, M., & Ohno, S. (2006). Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J. Gen. Virol.*, 87, 2767-79.

Anexo 1 – Ficha de biometria de cetáceos utilizado em todas as necrópsias.

ESPÉCIE			CÓDIGO:	
Data:		LAT: _____	LON: _____	
Local:				
Estado do corpo _____ (1-vivo; 2-fresco; 3-decomposição moderada (inchado, pele a sair, órgãos reconhecíveis); 4-decomposição avançada; 5 – restos)				
Peso: _____ Kg	Sexo: Macho <input type="checkbox"/> Fêmea <input type="checkbox"/> Impossível determinar <input type="checkbox"/>			
Estado nutricional: se o animal estiver inchado anotar <input type="checkbox"/> Bom aspecto <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Magro <input type="checkbox"/> esquelético <input type="checkbox"/> outro _____				
Estado da epiderme: <input type="checkbox"/> Completa; <input type="checkbox"/> Incompleta; <input type="checkbox"/> Outro: _____				
Espessura da camada adiposa (mm): 1: zona dorsal; 2: zona ventral a1: _____; b1: _____; c1: _____ a2: _____; b2: _____; c2: _____				
Perímetro (cm): a1: _____; b1: _____; c1: _____				

BIOMETRIAS (CM):



LOCALIZAÇÃO DO ANIMAL QUANDO ENCONTRADO								
Sol	<input type="checkbox"/>	Exposto ao sol	<input type="checkbox"/>	À sombra		Estado do tempo	<input type="text"/>	
Mar	<input type="checkbox"/>	Na rebentação	<input type="checkbox"/>	Acima da rebentação		Estado mar	<input type="text"/>	
Praia	<input type="checkbox"/>	Areia	<input type="checkbox"/>	Seixo	<input type="checkbox"/>	Pedra	Estado da maré	<input type="text"/>

Presença de: Barbas ☐ Dentes ☐

Barbas	N.º aprox. De barbas/hemi-maxila	<input type="text"/>	Dentes (n.º)	Max.sup.esq.	<input type="text"/>	Max.sup.dir.	<input type="text"/>
	N.º sulcos ventrais (contados entre as barbatanas peitorais)	<input type="text"/>		Max.inf.esq.	<input type="text"/>	Max.inf.dir.	<input type="text"/>
N.º e localização de dentes partidos:							

FOTOGRAFAR CORPO INTEIRO E DETALHES

Máquina fotográfica: _____

Anexo 2 – Ficha de recolha de amostras que é utilizada como guia de recolhas para todas as necrópsias de cetáceos.

RECOLHA DE AMOSTRAS

NOTA: anotar na tabela o número de réplicas das amostras recolhida (à frente dos órgãos a recolher está, entre parêntesis, o número de réplicas que se deve recolher).

TOXICOLOGIA	Metais Plastic	Organo Pap. Al
Amostras em papel de alumínio e saco plástico		
Pele+tec.adip.+musculo (1+1)		
Tecido adiposo (4+4)		
Musculo (4+4)		
Fígado (4+4)		
Rim (4+4)		
Pulmão (1+1)		
Estômago 1 (1+1)		
Estômago 2 (1+1)		
Estômago 3 (1+1)		
Intestino 2 (1+1)		
Baço (1+1)		
Pâncreas (1+1)		
Gl. Adrenais (1+1)		
5ª costela (1 só em plástico)		

MICROBIOLOGIA
Amostras de 2x2cm em saco plástico
Pele
Músculo
Gânglio pré-escapular
Timo
Tiróide
Pulmão
Coração
Fígado
Rim
Baço
Pâncreas
Estômago
Intestino
Gl. Adrenais

DIETA
Recolher o estômago completo ou o conteúdo estomacal; Não esquecer de pesar o conteúdo estomacal
Estômago
Conteúdo estomacal

PARASITOLOGIA
Recolher após as amostras de toxicologia, mic e histologia. Amostras de parasitas para identificação em álcool e para toxicologia em plástico. Lavar previamente os parasitas com água ultrapura.
ID
TOX
Fígado
Pulmão
Estômago 1
Estômago 2
Estômago 3

HISTOLOGIA
Amostras de 2x2cm em frasco de formol 10% tamponizado
Gânglio pré-escapular
Timo
Tiróide
Pulmão + linfonodo
Traqueia
Coração
Fígado
Rim
Baço
Pâncreas
Estômago
Intestino
Gl. Adrenais
Pele
Gordura
Musculo

REPRODUÇÃO
Amostras em formol 10% Diferenciar o testículo esq do dir
TESTICULOS
Esquerdo
Comprimento
Largura
Peso
Direito
Comprimento
Largura
Peso
OVARIOS + UTERO

IDADE
Recolher 10 dentes do meio da maxila inferior esquerda (5 em álcool e 5 para congelar)
Dentes álcool
Dentes congelar

OUTROS
Outras amostras colhidas
Sangue
Sangue bioquímica
Sangue EDTA
Leite
Humor aquoso
Líquido encéfalo-raquidiano
Intestino (20cm troço final)
Barbas
Crânio

GENETICA
Recolher pele e musculo
Pele
Musculo

CEDÊNCIA DE AMOSTRAS		
Instituição/pessoa	Data	Amostras (tecido e quantidade)
LOCAL DE ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS CONGELADAS		

Anexo 3 – Ensaios realizados às amostras de macerados de pulmão dos 37 cetáceos analisados por ELISA para detecção de anticorpos anti-CDV.

Tabela 1 - Resultados do teste ELISA anti-CDV (Ingezim) realizado a 12 amostras (cut-off= densidade óptica do Controlo Positivo X 0,2 = 0,324).

C+	1.621	SC/26/07 1:2	0.152
C-	0.049	SC/159/11 1:2	0.166
Lobo N	2.205	SC/257/11 1:2	0.335
Suíno 1:2	0.063	GM/35/08 1:2	0.172
SC/94/04 1:2	0.135	GM/42/08 1:2	0.056
SC/13/07 1:2	0.399	GM/19/09 1:2	0.575
SC/15/07 1:2	0.089	GM/47/09 1:2	0.089
SC/21/07 1:2	0.074	MMi/31/11 1:2	0.06

Tabela 2 - Resultados do teste ELISA anti-CDV (Ingezim) realizado às restantes amostras (n=26) (cut off = densidade óptica do Controlo Positivo x 0,2 = 0,343).

C+	1.717	DD/129/11 1:2	0.157	DD/162/11 1:2	0.164	DD/199/11 1:2	0.011
C-	0.04	DD/130/11 1:2	0.084	DD/166/11 1:2	0.081	DD/250/11 1:2	0.009
Lobo N	2.078	DD/132/11 1:2	0.074	DD/167/11 1:2	0.125	PP/253/11 1:2	0.185
Suíno 1:2	0.031	DD/133/11 1:2	0.055	DD/175/11 1:2	0.058	PP/255/11 1:2	0.016
DD/125/11 1:2	0.345	DD/134/11 1:2	0.385	DD/176/11 1:2	0.175	DD/256/11 1:2	0.013
DD/126/11 1:2	0.054	DD/141/11 1:2	0.032	DD/183/11 1:2	0.137	DD/258/11 1:2	0.017
DD/127/11 1:2	0.063	DD/156/11 1:2	0.037	DD/186/11 1:2	0.106		
DD/128/11 1:2	0.105	DD/160/11 1:2	0.082	DD/198/11 1:2	0.201		

Tabela 3 - Teste de ELISA anti-CDV (Ingezim) realizado a amostras previamente testadas (positivas a 1:2) em três diluições e às restantes 9 consideradas para repetição (cut off = densidade óptica do controlo positivo = 0,4).

C+	2.036	SC/257/11 1:4	0.108	DD/125/11 1:2	0.372	SC/159/11 1:2	0.135	DD/162/11 1:2	0.189
C-	0.022	GM/19/09 N	0.848	DD/125/11 1:4	0.204	GM/35/08 N	0.171	PP/253/11 N	1.106
Suíno N	0.033	GM/19/09 1:2	0.674	DD/134/11 N	0.835	GM/35/08 1:2	0.124	PP/253/11 1:2	0.153
Suíno 1:2	0.013	GM/19/09 1:4	0.502	DD/134/11 1:2	0.49	DD/183/11 N	0.206	DD/176/11 N	0.262
Lobo N	2.255	SC/13/07 N	0.6	DD/134/11 1:4	0.286	DD/183/11 1:2	0.15	DD/176/11 1:2	0.179
Lobo 1:2	1.222	SC/13/07 1:2	0.482	SC/26/07 N	0.32	DD/129/11 N	0.31	DD/198/11 N	0.301
SC/257/11 N	0.693	SC/13/07 1:4	0.438	SC/26/07 1:2	0.201	DD/129/11 1:2	0.194	DD/198/11 1:2	0.203
SC/257/11 1:2	0.281	DD/125/11 N	0.704	SC/159/11 N	0.426	DD/162/11 N	0.464	Lobo 1:4	1.219

Anexo 4 – Resumo da comunicação científica apresentada no Congresso Microbiotec'11 de 1-3 de Dezembro na Universidade do Minho e comprovativo de aceitação.

Dolphin morbillivirus in Portugal: first report in stranded cetaceans

Carolina Bento 1, Ana Duarte 1, Marisa Ferreira 2, Fernando Afonso 1, José Vingada 2,3 , Luis Tavares 1

1 CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa

Av da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Dep. Biologia e Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem. Universidade do Minho. Campus de Gualtar, 4710-057 Braga

3 Centro de Estudos sobre Ambiente e Mar. Universidade de Aveiro. Campus Universitário de Santiago. 3810-193 Aveiro

Keywords: Dolphin morbillivirus; molecular epidemiology

Dolphin morbillivirus (DMV) and Porpoise morbillivirus (PMV) are members of the subfamily Paramyxovirinae, family Paramyxoviridae. These viruses are important pathogens of cetaceans, causing serious respiratory and central nervous system infections, leading to stranding and death. Since 1987 DMV and PMV are responsible for several epidemics in cetacean populations worldwide [1].

To date no information regarding the presence of these viral pathogens in stranded cetaceans in the coast line of Portugal is available. Due to the pathogenic impact of DMV a molecular survey was conducted for detection of viral RNA from biological materials of stranded cetaceans available through the National Marine Mammal Stranding Network and through the CRAM-Q - Quiaios Marine Animal Rehabilitation Centre, Portugal.

Lung and brain samples (n=40) were collected between 2004-2011 from 25 *Delphinus delphis* (Dd), 4 *Globicephala melas* (Gm) and 8 *Stenella soeruleoalba* (Sc), 2 *Phocoena phocoena* (Pp) and 1 *Mesoplodon mirus* (Mm). After total RNA extraction the samples were screened by conventional one step RT-PCR. The primers targeting a 550bp fragment included in the M gene of the DMV/PMV genome were chosen by the Primer designing tool available through <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. The expected amplicon was detected in the lung samples of two Sc and one Gm, collected in 2007, 2011 and 2008 respectively. After sequencing its specificity was confirmed against the NCBI nucleotide database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sharing 99% homology with the two available sequences of DMV M gene.

Our results confirmed the presence of DMV RNA in samples collected from stranded cetaceans which may indicate subclinical infection of these animals. Interestingly one Gm (2008) was found positive and this species may act as virus reservoirs for other cetacean species [2]. The biological significance

of this finding emphasizes the need for a more thorough investigation regarding the virus temporal pattern in Atlantic waters and its potential correlation to the occurrence of past and future epizootics of the disease [3].

1. Guardo, G.D., et al., J.Vet. Med. Series A, 2005. **52**(2): p. 88-93.
2. Bossart, G.D., et al., Vet. Microb., 2010. **143**(2-4): p. 160-166.
3. Raga, J.A., et al., Emerg. Infect. Dis., 2008. **14**(3): p. 471-473.

Comprovativo de aceitação:

From: Microbiotec'11 <microbiotec11@ecsau.de.uminho.pt>
Sent: quarta-feira, 26 de Outubro de 2011 12:40
To: anaduarte@fmv.utl.pt
Cc: mcarolinabento@gmail.com; mctferreira@socpvs.org; fafonso@fmv.utl.pt; spvs@socpvs.org; ltavares@fmv.utl.pt
Subject: Microbiotec'11

Dear Prof. Ana Isabel Duarte,

It is our pleasure to inform you that your abstract has been accepted for **poster presentation** at the Microbiotec11 meeting, from 1-3 December 2011, at University of Minho, Braga, Portugal.

The maximum poster size should be 120cm tall and 80 cm wide.

An **Updated Program** of the meeting can be found on line at: <http://microbiotec11.org/program/>

We remind you that for **Early Registration**, payment is due until **7th November**.

For your abstract to be included in the Abstract Book, we would like to remind the **Presenting Authors** that their registration is required before the **18th November**.

Hoping to meet you in the opening session of Microbiotec11.

Best regards,

The organizing committee

CONTRIBUTION DETAILS

ID: 239

Title: Dolphin morbillivirus in Portugal: first report in stranded cetaceans"